SEKUNDÄRE OXYGENIERUNG DES CARCINOGENS 2-ACETYLAMINOFLUOREN IN VITRO UND IN VIVO

Biotransformation von 2-Acetylaminofluoren und 2-Acetylaminofluoren-9on in vitro und in vivo

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

eingereicht beim Fachbereich
Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Roswitha Rosenbauer-Thilmann
aus Unkel/Rhein

München 1978

1979

SEKUNDÄRE OXYGENIERUNG DES CARCINOGENS 2-ACETYLAMINOFLUOREN IN VITRO UND IN VIVO

Biotransformation von 2-Acetylaminofluoren und 2-Acetylaminofluoren-9on in vitro und in vivo

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

eingereicht beim Fachbereich

Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Roswitha Rosenbauer-Thilmann

aus Unkel / Rhein

München 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter : Prof. Dr. W. Lenk

2. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Schönenberger

Tag der mündlichen Prüfung : 19.2.1979

M e i n e r M u t t e r

g e w i d m e t

Abkürzungen

2-AF	=	2-Aminofluoren; C.A.: [9-H-fluoren-2-amine]
2-AAF	=	2-Acetylaminofluoren; C.A.: [N-9-H-fluoren-2yl-acetamide]
2-AAF-9on	=	2-Acetylaminofluorenon; C.A.: [N-(9-oxo-9-H-fluoren-2yl)-acetamide]
NOH-2-AAF	=	N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren; C.A.: [N-9-H-fluoren-2yl-N-hydroxy-acetamide]
2-AAF-1ol	=	2-Acetylaminofluoren-1ol; C.A.: [N-(1-hydroxy-9-H-fluoren-2yl)-acetamide]
2-AAF-3ol	=	2-Acetylaminofluoren-3ol; C.A.: [N-(3-hydroxy-9-H-fluoren-2yl)-acetamide]
2-AAF-4ol	=	2-Acetylaminofluoren-4ol; C.A.: [N-(4-hydroxy-9-H-fluoren-2yl)-acetamide]
2-AAF-5ol	=	2-Acetylaminofluoren-5ol; C.A.: [N-(5-hydroxy-9-H-fluoren-2yl)-acetamide]
2-AAF-6ol	=	2-Acetylaminofluoren-6ol; C.A.: [N-(6-hydroxy-9-H-fluoren-2yl)-acetamide]
2-AAF-7ol	=	2-Acetylaminofluoren-7ol; C.A.: [N-(7-hydroxy-9-H-fluoren-2yl)-acetamide]
2-AAF-8ol	=	2-Acetylaminofluoren-8ol; C.A.: [N-(8-hydroxy-9-H-fluoren-2yl)-acetamide]
2-AAF-9ol	=	2-Acetylaminofluoren-9ol; C.A.: [N-(9-hydroxy-9-H-fluoren-2yl)-acetamide]
2-AAF-9on-3ol	=	2-Acetylaminofluorenon-3ol; C.A.: [N-(3-hydroxy-9-oxo-9-H-fluoren-2yl)-acetamide]
2-AAF-9on-5ol	=	2-Acetylaminofluorenon-5ol; C.A.: [N-(5-hydroxy-9-oxo-9-H-fluoren-2yl)-acetamide]
2-AAF-9on-7ol	=	2-Acetylaminofluorenon-7ol; C.A.: [N-(7-hydroxy-9-oxo-9-H-fluoren-2yl)-acetamide]
2-AAF-9.3-diol	=	2-Acetylaminofluoren-9.3-diol; C.A.: [N-(9.3-dihydroxy-9-H-fluoren-2yl)-acetamide]
2-AAF-9.5-diol	=	2-Acetylaminofluoren-9.5-diol; C.A.: [N-(9.5-dihydroxy-9-H-fluoren-2yl)-acetamide]
2-AAF-9.7-diol	=	2-Acetylaminofluoren-9.7-diol; C.A.: [N-(9.7-dihydroxy-9-H-fluoren-2yl)-acetamide]

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

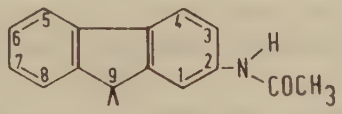
		Seite
1.	EINLEITUNG	1 - 2
2.	ERGEBNISSE	3 - 77
2.1.	Chemischer Teil Synthesen von bekannten und neuen Derivaten des 2-AAF Elektronenspektren Massen- und NMR-Spektren	3 - 36
2.2.	Biologischer Teil	37 - 77
2.2.1.	In Vitro - Versuche	37 - 39
	2.2.1.1. mit 2-AAF als Substrat und verschiedenen Fraktionen von Ratten- und Kaninchenleberhomogenat	37 - 38
	2.2.1.2. mit 2-AAF-9on als Substrat und verschiedenen Fraktionen von Ratten- und Kaninchenleberhomogenat	38 - 39
2.2.2.	In Vivo - Versuche	39 - 77
	2.2.2.1. mit einem Gemisch von NOH-2-AAF und [9-^{14}C]-2-AAF	39 - 44
	2.2.2.2. mit nichtmarkiertem 2-AAF	45 - 47
	2.2.2.3. mit 2-AAF-9on	47 - 48
	Tabellen, Abbildungen und Figuren zu den Ergebnissen des Biologischen Teils	49 - 77

		Seite
3.	DISKUSSION	78 - 83
4.	ZUSAMMENFASSUNG	84 - 86
5.	BIOCHEMICA, CHEMIKALIEN, GERÄTE UND METHODEN	87 - 101
	Tabelle und Figuren zum Methodischen Teil	
6.	LITERATUR	102 - 106

1. EINLEITUNG

2-Acetylaminofluoren, das als Insektizid in den Handel kommen sollte, wirkt in den meisten Species carcinogen.

Untersuchungen der Biotransformation dieses polycyclischen N-Aryl-acetamids



in verschiedenen Species haben gezeigt, daß nicht nur C-Atome in verschiedenen Positionen des aromatischen Grundgerüstes (1 - 4), sondern auch das N-Atom (5) und der Essigsäurerest der Säureamidgruppierung hydroxyliert werden können (6).
Während die ringhydroxylierten Metabolite des 2-AAF keine oder eine sehr viel geringere carcinogene Wirkung als 2-AAF haben (7 - 11), ist die N-Hydroxyverbindung stärker carcinogen als die Ausgangsverbindung. 2-AAF, das im Meerschweinchen nicht carcinogen wirkt, wird in dieser Species entweder nicht N-hydroxyliert, oder das N-Hydroxyderivat wird sehr schnell in nicht-carcinogene Metabolite umgewandelt (12 - 14).
Untersuchungen über den Mechanismus der durch 2-AAF bzw. N-Hydroxy-2-AAF induzierten Carcinogenese (15 - 19) haben gezeigt, daß die N-Hydroxylierung eine zwar notwendige biochemische Aktivierung darstellt (Bildung des proximate carcinogen), daß aber, um die carcinogene Wirkung zu erklären, weitere biochemische Aktivierungen notwendig sind.
Ein reaktionsfähiges Molekül entsteht entweder durch Veresterung des am Stickstoff gebundenen Hydroxyls, aus dem durch nukleophilen Austritt das elektrophile N-acetyl-N-

aryl-nitrenium-Ion (" Bildung des ultimate carcinogen ") gebildet wird (20 - 21), oder es wird durch N-Deacetylierung, Protonierung und Wasserabspaltung in das elektrophile N-aryl-nitrenium-Ion überführt. Beide reagieren mit nukleophilen Zellbestandteilen, wie z.B. Proteinen oder den Basen des genetischen Codes (22 - 24).

BENKERT et al. (25) fanden, daß auch das cycloaliphatische C-Atom in 9-Stellung des Fluorens von den mischfunktionellen Oxygenasen des endoplasmatischen Reticulums oxygeniert wird. Während in vitro mit isolierten Lebermikrosomen eine hohe Geschwindigkeit der C_9-Hydroxylierung gemessen wurde, waren die im Harn von Ratten und Meerschweinchen gefundenen Mengen dieses Oxidationsproduktes bzw. seines Dehydrierungsproduktes außerordentlich gering. Das ließ darauf schließen, daß das primäre Oxidationsprodukt oder sein Dehydroderivat im Organismus weiter abgebaut wird.
Diese unbekannten Stoffwechselwege aufzuklären, war das Ziel der vorliegenden Arbeit.

2. E R G E B N I S S E

2.1. Chemischer Teil

Synthesen von bekannten und neuen Derivaten des 2-AAF

N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren

1. E.C. MILLER, J.A. MILLER, H.A. HARTMANN:
   Cancer Res. 21, 815 (1961)
2. L.A. POIRIER, J.A. MILLER and E.C. MILLER:
   Cancer Res. 23, 799 (1963)
3. J.W. CRAMER, J.A. MILLER and E.C. MILLER:
   J. biol. Chem. 235, 885 (1960)

N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren wurde durch hydrierende Acetylierung von 2-Nitrofluoren (käufliches Produkt) und anschließende partielle Verseifung des N,O-Diacetats mit halbkonzentriertem Ammoniak dargestellt, wie bei MILLER et al. und POIRIER et al. beschrieben. Umkristallisiert aus Essigester oder Äther (im Tiefkühlfach). UV-Absorptionsspektrum: s. Abb. 1.
(Lit.: UV-Daten: J.W. CRAMER et al.)

Acetylaminobiphenylcarbonsäuren

wurden von D. SACKERER nach Lit. (E.H. HUNTRESS and Margaret K. SEIKEL: J. Am. chem. Soc. 67, 1072 (1945)) synthetisiert. UV-Absorptionsspektren: s. Abb. 2 und 3.

2-Acetylaminofluoren-5ol

Synthese nach: E.K. WEISBURGER und J.H. WEISBURGER (J. org. Chem. 20, 1396 (1955)).
Massenspektrum: s. Fig. 1.
NMR-Spektrum: s. Tab. 1.
UV-Absorptionsspektrum: s. Abb. 4.
(Lit.: UV: s.o.)

2-Acetylaminofluoren-9on

wurde nach E.H. HUNTRESS, E.B. HERSBERG and I.S. CLIFF (J. Am. Chem. Soc. 53, 2720 (1931)) synthetisiert.
UV-Absorptionsspektrum: s. BENKERT et al. (25).

2-Acetylaminofluoren-4ol (neue Verbindung)

2-Aminofluoren-4ol (ein Geschenk von Prof. Fletcher, Fred. Hutchinson Cancer Res. Cent., Seattle, USA) wurde acetyliert.
UV-Absorptionsspektrum: s. Abb. 5.

2-Acetylaminofluoren-7ol

2-AAF-7ol wurde aus dem Harn von Kaninchen isoliert, denen 2-AAF i.p. injiziert worden war. 2-AAF-7ol ist der Hauptmetabolit von 2-AAF im Kaninchen.
UV-Absorptionsspektrum: s. Abb. 6.

2-Acetylaminofluoren-6ol

wurde nach E.K. WEISBURGER und J.H. WEISBURGER (J. org. Chem. 23, 1193 (1958)) synthetisiert.
UV-Absorptionsspektrum: s. Abb. 7.

2-Acetylaminofluoren-8ol

Lit.: E.K. WEISBURGER and J.H. WEISBURGER, J. org. Chem. 21, 1386 (1956).

a) 7-Nitro-1-fluorenylcarbonsäure
Zu einer Suspension von 1 g 1-Fluorenylcarbonsäure (käufliches Produkt) in 40 ml Eisessig werden bei 45° Badtemperatur 5 ml konz. HNO_3 tropfenweise zugegeben. Beim vorsichtigen Erwärmen bildet sich ein Niederschlag. Man gießt den Ansatz auf Eis, wobei sich ein gelber Niederschlag bildet, der abfiltriert und zuerst mit Eisessig und dann mit Wasser gewaschen wird.
UV-Absorption in Methanol: λ_{max} = 323 nm (Lit.: 327 nm

in Äthanol). Es handelt sich um eine chromatographisch einheitliche Verbindung.

b) 1-Amino-7-nitrofluoren

Zu einer Lösung von 1 g 7-Nitro-1-fluorenylcarbonsäure in 7 ml konz. H_2SO_4 wurden 1,4 ml rauchende H_2SO_4 (30 % SO_3) und 10 ml Chloroform gegeben und die Mischung auf 40° erwärmt. Nach Zusatz von 400 mg NaN_3 wurde 3 Stunden gerührt und nach Abtrennung der Chloroformphase auf Eis gegossen. Der auf Zusatz von Natronlauge entstehende Niederschlag wurde abgenutscht und in Benzol aufgenommen. Es handelt sich um eine chromatographisch einheitliche Substanz.

c) 1-Hydroxy-7-nitrofluoren

Zu einer Lösung von 460 mg 1-Amino-7-nitrofluoren in 16 ml Eisessig wurde eine Mischung von 2 ml H_2O und 6 ml konz. H_2SO_4 gegeben. In einem Eis-Kochsalzbad (Temp. ca. 5° C) fügte man eine Lösung von 280 mg Natriumnitrit in 3 ml H_2O und nach einstündigem Rühren 500 mg Harnstoff zu. Die Diazoniumsalzlösung wurde langsam zu einer Mischung von 20 ml H_2O, 10 ml Xylol und 3 ml verd. H_2SO_4 getropft und anschließend unter Rückfluß 15 Stunden erhitzt. Man goß den Ansatz auf Eis, filtrierte den Niederschlag ab, löste das Rohprodukt in Cyclohexan, gab die Lösung auf eine Säule aus Kieselgel 60 und entwickelte das Chromatogramm mit Cyclohexan : Essigester = 70 : 30.

d) 2-Acetaminofluoren-8ol

Zu einer Lösung von 140 mg 1-Hydroxy-7-nitrofluoren in 50 ml Essigester gab man 4 ml Acetanhydrid und 0,4 ml Eisessig, führte die Lösung in eine kleine Hydrierente über und gab unter N_2 20 mg Pd-Kohle (5 % Pd) hinzu. Man schüttelte in einer H_2-Atmosphäre, bis die theoretisch berechnete Menge H_2 aufgenommen wurde, filtrierte vom Katalysator ab, engte

i. Vak. ein und versetzte mit H_2O, worauf ein farbloser Niederschlag entstand, der abgesaugt und aus verd. Äthanol umkristallisiert wurde.
NMR-Spektrum: s. Tab. 1
UV-Absorptionsspektrum: s. Abb. 8.

Die Verbindung ist autoxydabel und wird leicht in 2-AAF-9on-8ol überführt !

2-Acetylaminofluoren-1ol

Lit.: E.K. WEISBURGER and J.H. WEISBURGER, J. org. Chem. 19, 964 (1954)

a) 1-Hydroxy-2-nitrofluoren
Eine Lösung von 4,2 g 1-Hydroxyfluoren (käufliches Produkt) in 90 ml Eisessig wurde im Eis-Kochsalzbad (Temp. 5° C) gekühlt und nach Zugabe von 1,5 ml konz. HNO_3 und 1,5 ml H_2O eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der auf Zugabe von H_2O entstehende braune Niederschlag wurde abfiltriert, in Benzol aufgenommen und die Lösung auf eine Aluminiumoxidsäule (Aktivitätsstufe III) gegeben. Mit einem Gemisch von Äthanol : Benzol = 1 : 99 wurde 1-Hydroxy-2-nitrofluoren zuerst eluiert.

b) 2-Acetylaminofluoren-1ol
Zu einer Lösung von 400 mg 1-Hydroxy-1-nitrofluoren in 50 ml Essigester gab man 10 ml Acetanhydrid und 1 ml Eisessig und hydrierte die Lösung nach Zusatz von 50 mg Palladiumaktivkohle. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. versetzte man mit Wasser, filtrierte den farblosen Niederschlag ab und kristallisierte ihn aus verdünntem Äthanol um.
NMR-Spektrum: s. Tab. 1.
UV-Spektrum: s. Abb. 9.

2-Acetylaminofluoren-3ol

Lit.: E.K. WEISBURGER and J.H. WEISBURGER, J. org. Chem. 19, 964 (1954).

a) 3-Aminofluoren

Eine Lösung von 1 g 3-Nitrofluoren (käufliches Produkt) in 40 ml Essigester wurde mit 10 ml Methanol und 1 ml Eisessig versetzt und unter Zugabe von 100 mg Palladiumaktivkohle hydriert.
Bei der Aufarbeitung zeigte sich, daß neben 3-Aminofluoren noch 3-Aminofluoren-9on anwesend ist, die getrennt wurden.

b) 3-Hydroxyfluoren

Zu einer heißen Lösung von 500 mg 3-Aminofluoren in 30 ml Eisessig wurden 5 ml 18 M H_2SO_4 gegeben und die Mischung auf 15° C abgekühlt. Dann gab man eine Lösung von 180 mg Natriumnitrit in 15 ml H_2O dazu, rührte 1 Stunde, setzte dann Harnstoff zu und goß diese Mischung in 60 ml siedende 5 M H_2SO_4. Ein beim Abkühlen entstehender bräunlicher Niederschlag wurde verworfen und das Filtrat auf Eis gegossen, wobei ein gelber Niederschlag entstand, der aus 3-Hydroxyfluoren bestand.

c) 3-Hydroxy-2-nitrofluoren

Zu einer Lösung von 200 mg 3-Hydroxyfluoren in 10 ml Eisessig wurde 0,1 ml HNO_3 gegeben und die Mischung zuerst 10 Minuten auf 80° C erhitzt und dann 1 Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Ein nach Zusatz von Eis entstehender gelber Niederschlag wurde abgesaugt und zur Abtrennung von Dinitroprodukten auf eine Säule aus Kieselgel gegeben. Beim Eluieren mit Chloroform erhielt man zuerst 3-Hydroxy-2-nitrofluoren.

Durch Umkristallisieren aus 70 % Äthanol erhielt man gelbe Kristalle vom Fp. 162° C.

d) 2-Acetylaminofluoren-3ol

Zu einer Lösung von 100 mg 3-Hydroxy-2-nitrofluoren in 10 ml Essigester gab man 3 ml Acetanhydrid und 1 ml Eisessig und hydrierte die Mischung mit 50 mg Palladiumkohle.

Nach Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. versetzte man mit Wasser, filtrierte den farblosen Niederschlag ab und kristallisierte das 2-Acetylaminofluoren-3ol aus verd. Alkohol um.

NMR-Spektrum: s. Tab. 1.

UV-Absorptionsspektrum: s. Abb. 10.

2-Acetylaminofluoren-9on-3ol (neue Verbindung)

a) 3-Hydroxyfluoren-9on

Zu einer Lösung von 500 ml des bei der Hydrierung von 3-Nitrofluoren-9on entstandenen 3-Aminofluoren-9on in Eisessig gab man 5 ml 18 M H_2SO_4 und hielt die Mischung bei 15° C. Dann gab man eine Lösung von 150 mg Natriumnitrit in 10 ml H_2O dazu, rührte eine Stunde, setzte dann Harnstoff zu und goß die Mischung in 60 ml siedende 5 M H_2SO_4. Der beim Abkühlen entstandene Niederschlag wurde verworfen und das Filtrat auf Eis gegossen, wobei das 3-Hydroxy-fluoren-9on ausfiel.

b) 3-Hydroxy-2-nitrofluoren-9on

Zu einer Lösung von 200 mg 3-Hydroxyfluoren-9on in 10 ml Eisessig wurde 0,1 ml konz. HNO_3 gegeben und die Mischung zuerst auf 80° C erhitzt und dann 1 Stunde bei Zimmertemperatur weitergeführt. Ein nach Zusatz von Eis entstehender Niederschlag wurde zur Abtrennung von Dinitroprodukten auf eine Kieselgelsäule gegeben. Beim Eluieren mit Chloroform erhielt man zuerst das 3-Hydroxy-2-nitrofluoren-9on.

c) 2-Acetylaminofluoren-9on-3ol (neue Verbindung)

Zu einer Lösung von 100 mg 3-Hydroxyfluoren-9on in 10 ml Essigester gab man 3 ml Acetanhydrid, 3 ml

Methanol und 1 ml Eisessig und schüttelte die Mischung nach Zusatz von 30 mg Pd-Kohle in einer H_2-Atmosphäre, bis die theoretisch berechnete Menge H_2 aufgenommen worden war.
Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels entstand auf Zusatz von H_2O ein orange-gelber Niederschlag; nach Umkristallisieren aus Chloroform: Fp. 264° C.
NMR-Spektrum: s. Tab. 1.
UV-Absorptionsspektrum: s. Abb. 11.

2-Acetylaminofluoren-9.3-diol (neue Verbindung)

Zu einer methanolischen Lösung von 2-Acetylaminofluoren-9on-3ol gab man 2 Spatelspitzen $NaBH_4$, worauf sich die Lösung tief gelbrot färbte und H_2-Entwicklung einsetzte. Nach kurzer Zeit hatte sich die Lösung aufgehellt; sie wurde in 2 M H_2SO_4 gegossen und mit Essigester geschüttelt. Der Essigesterextrakt enthielt, wie die chromatographische Untersuchung zeigte, neben Ausgangsmaterial das gesuchte 2-AAF-9.3-diol und 2-AAF-3ol.
Beim Versuch, 2-AAF-9on-3ol durch katalytische Hydrierung mit Pd-Kohle in Essigesterlösung in das 2-AAF-9.3-diol zu überführen, wurde nur 2-AAF-3ol erhalten.
UV-Absorptionsspektrum: s. Abb. 12.

2-Acetylaminofluoren-9on-5ol (neue Verbindung)

Lit.: F.J. MOORE and E.H. HUNTRESS, J. Am. Chem. Soc. 49, 1324 (1977)

a) 2-Nitrofluoren-9on-5-carbonsäure
Eine Lösung von 6,6 g Fluoren-9on-5carbonsäure (käufliches Produkt) in 67 ml HNO_3 (d = 1,42) wurde zum Sieden erhitzt und anschließend auf Eis gegossen. Der gelbe Niederschlag wurde aus Eisessig umkristallisiert, wobei das zuerst ausfallende 7-Nitroprodukt verworfen wurde.
Beim Versuch, das Nitroderivat mit NaN_3 umzusetzen (Schmidt Reaktion), zeigte sich, daß das Natriumazid

auch mit der Carbonylgruppe in 9-Stellung reagiert, wodurch es zu einer Ringerweiterung kommt. Als Alternative bot sich der Hofmannabbau an.

b) 2-Nitrofluoren-9on-5-carboxamid

Lit.: E.H. HUNTRESS, K. PFISTER and K.H.T. PFISTER, J. Am. Soc. 64, 2845 (1942).

2 g 2-Nitrofluoren-9on-5-carbonsäure wurden mit 10 ml Thionylchlorid unter Rückfluß gekocht und darauf überschüssiges Reagenz i.Vak. abdestilliert. Das zurückbleibende Säurechlorid wurde in trockenem Dioxan gelöst und in die Lösung Ammoniak eingeleitet. Der sich bildende gelbe Niederschlag wurde nach Waschen mit Wasser getrocknet und aus Eisessig umkristallisiert: Fp. 270°.

c) 5-Amino-2-nitrofluoren-9on

400 mg 2-Nitrofluoren-9on-5-carboxamid wurden mit 6 ml Wasser verrührt und die Suspension zu einer auf 0° C gekühlten alkalischen Hypobromitlösung, bestehend aus 0,3 g Brom, 2 ml H_2O und 0,6 g KOH in 4 ml H_2O, gegeben. Man rührte bei Zimmertemperatur 2 Stunden weiter, saugte den Niederschlag ab und verwarf ihn. Wenn man 75 Minuten auf 100° C erhitzte, entstand ein gelbroter Niederschlag, der abgesaugt, gewaschen und getrocknet wurde.

d) 5-Hydroxy-2-nitrofluoren-9on

Zu einer Lösung von 5-Amino-2-nitrofluoren-9on in 0,6 ml kalter konz. H_2SO_4 gab man eine wässrige Lösung von 77 mg Natriumnitrit und rührte die Mischung eine Stunde. Dann gab man Eiswasser dazu und erhitzte zum Sieden. Der entstehende gelbrote Niederschlag wurde abgesaugt, in 2 M NaOH aufgenommen und mit 2 M HCl das 5-Hydroxy-2-nitrofluoren-9on ausgefällt.

e) 2-Acetylaminofluoren-9on-5ol (neue Verbindung)
Zu einer Lösung von 80 mg 5-Hydroxy-2-nitrofluoren-9on in 25 ml Eisessig gab man 2,5 ml Methanol, 2,5 ml Acetanhydrid und 0,4 ml Eisessig und schüttelte die Mischung nach Zusatz von 25 mg Pd-Kohle in einer H_2-Atmosphäre. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der Rückstand mit Wasser versetzt, worauf 2-Acetylaminofluoren-9on-5ol ausfiel. Fp. 273°.
NMR-Spektrum: s. Tab. 1.
UV-Absorptionsspektrum: s. Abb. 13.

2-Acetylaminofluoren-9.5-diol (neue Verbindung)

Diese Verbindung wurde erhalten:

a) durch Meerwein-Pondof-Verley-Reduktion,
b) durch katalytische Hydrierung von 2-AAF-9on-5ol.

Die Reindarstellung erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie. Die Verbindung ist autoxydabel.
UV-Absorptionsspektrum: s. Abb. 14.

2-Acetylamino-9on-7ol (neue Verbindung)

Lit.: F. GOULDEN and G.A.R. KON, J. Chem. Soc. 2, 930 (1945)
G.W. GRAY, J.B. HARTLEY, A. IBBELSON, J. Chem. Soc. 3, 2686 (1955)
A. ECKERT und E. LANGECKER, J. prakt. Chem. 226, 263 (1928)

a) 2-Amino-7-nitrofluoren-9on
Zu einer Lösung von 1 g 2-Aminofluoren-9on (käufliches Produkt) in 10 ml konz. H_2SO_4 wurde 1 ml Nitriersäure (1 Teil HNO_3 [d = 1,43] und 2 Teile konz. H_2SO_4) getropft und die Mischung 1 Stunde gerührt. Die Mischung wurde auf Eis gegossen, der entstehende braune Niederschlag in heißem Wasser aufgenommen und mit Natronlauge 2-Amino-7-nitrofluoren-9on ausgefällt.

b) 2-Hydroxy-7-nitrofluoren-9on

Man löste 400 mg 2-Amino-7-nitrofluoren-9on in 0,6 ml kalter konz. H_2SO_4, gab eine wässrige Lösung von 130 mg Natriumnitrit zu und rührte 1 Stunde. Nach Zugabe von Eiswasser erhitzte man zum Sieden, filtrierte den Niederschlag ab und nahm ihn in 2 M NaOH auf. Beim Ansäuern fiel 2-Hydroxy-7-nitrofluoren-9on aus.

c) 2-Acetylaminofluoren-9on-7ol (neue Verbindung)

Zu einer Lösung von 80 mg 2-Hydroxy-7-nitrofluoren-9on in 25 ml Essigester gab man 2,5 ml Methanol, 2,5 ml Acetanhydrid und 0,5 ml Eisessig und hydrierte nach Zusatz von 25 mg Pd-Kohle. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde Wasser zugesetzt, worauf 2-Acetylaminofluoren-9on-7ol ausfiel.
Nach Umkristallisieren aus verdünntem Äthanol: Fp. 335°.
Massenspektrum: s. Fig. 2.
NMR-Spektrum: s. Tab. 1.
UV-Absorptionsspektrum: s. Abb. 15.

2-Acetylaminofluoren-9.7-diol (neue Verbindung)

Diese Verbindung wurde durch

a) Meerwein-Pondorf-Verley-Reduktion und
b) katalytische Hydrierung von 2-AAF-9on-7ol erhalten und durch präparative Dünnschichtchromatographie dargestellt.

Sie ist wie 2-AAF-9.5-diol autoxydabel und verfärbt sich auf der Platte bei Zutritt von Luft rasch.
UV-Absorptionsspektrum: s. Abb. 16.

Elektronenspektren

von bekannten und neuen Derivaten

des 2-AAF

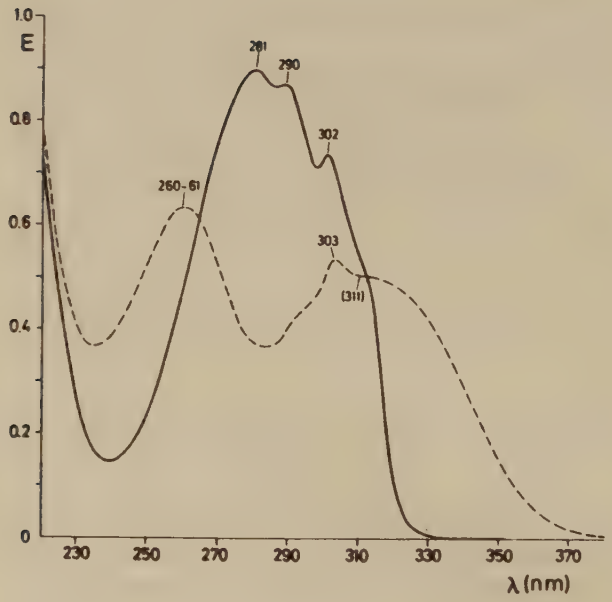


Abb. 1 : UV-Absorptionsspektrum von
N-Hydroxy-2-Acetylaminofluoren
——— in neutralem Methanol
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

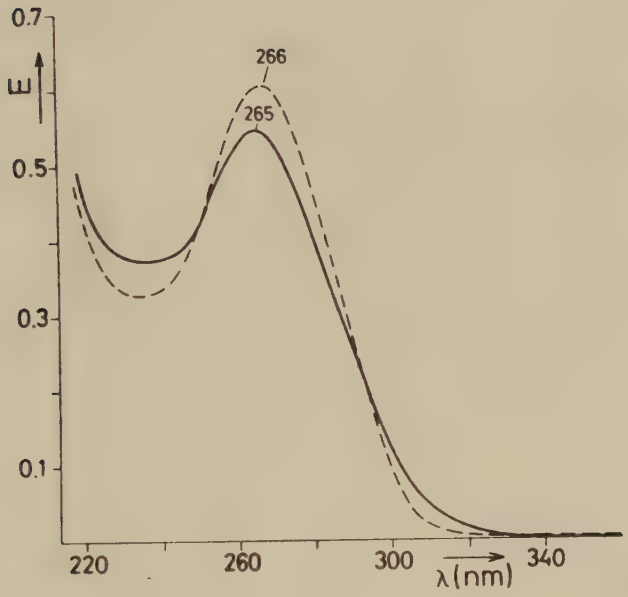


Abb. 2 : UV-Absorptionsspektrum von
2,4'-Acetylaminobiphenylcarbonsäure
——— in neutralem Methanol (c = 0,007 mg/ml)
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

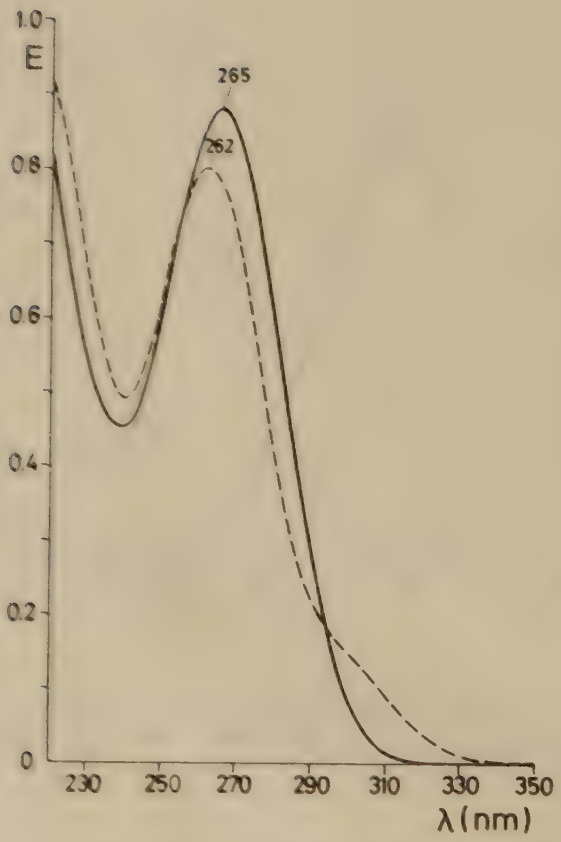


Abb. 3 : UV-Absorptionsspektrum von
2,4-Acetylaminobiphenylcarbonsäure
——— in neutralem Methanol (c = 0,010 mg/ml)
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

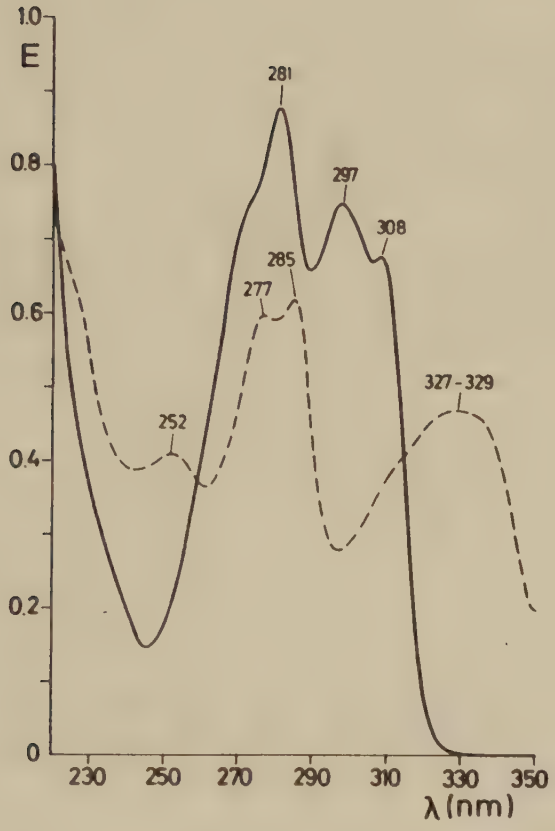


Abb. 4 : UV-Absorptionsspektrum von
2-Acetylaminofluoren-5ol
——— in neutralem Methanol (c = 0,012 mg/ml)
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

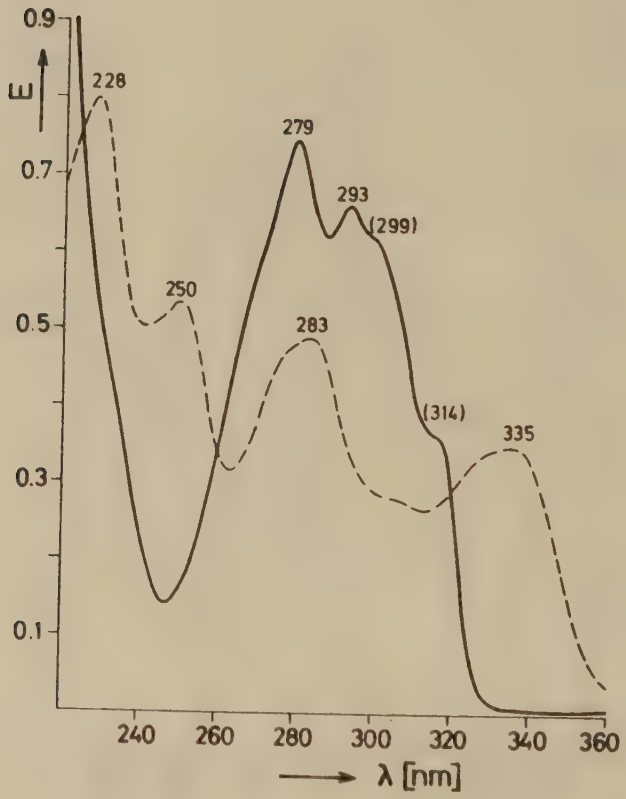


Abb. 5 : UV-Absorptionsspektrum von
2-Acetylaminofluoren-4ol
——— in neutralem Methanol
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

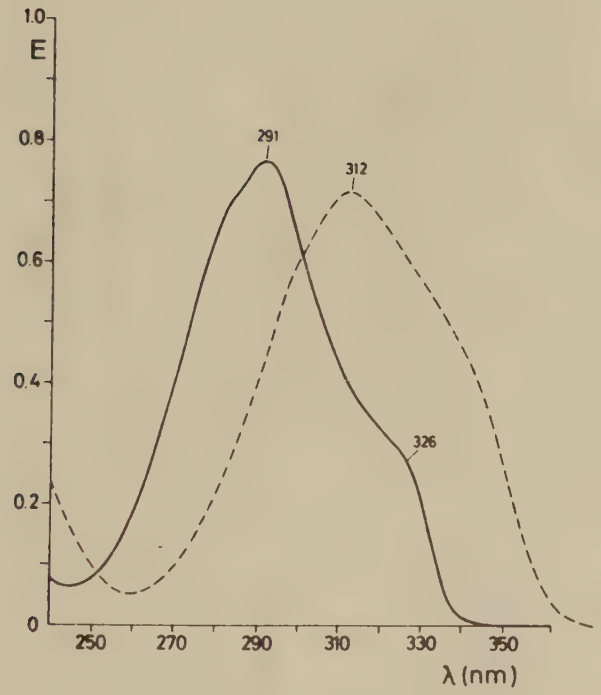


Abb. 6 : Uv-Absorptionsspektrum von
2-Acetylaminofluoren-7ol
——— in neutralem Methanol (c = 0,006 mg/ml)
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

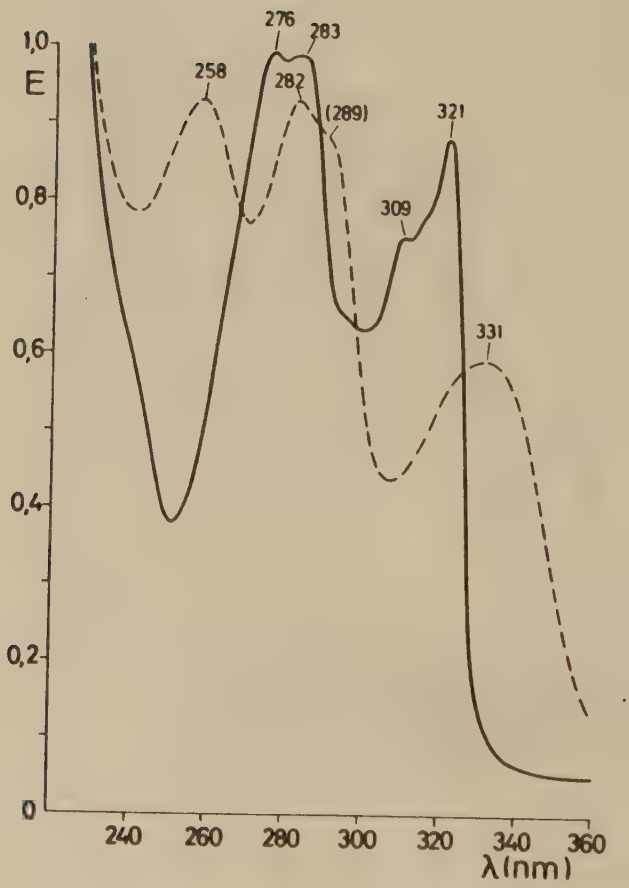


Abb. 7 : UV-Absorptionsspektrum von 2-Acetylaminofluoren-6ol

——— in neutralem Methanol

----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

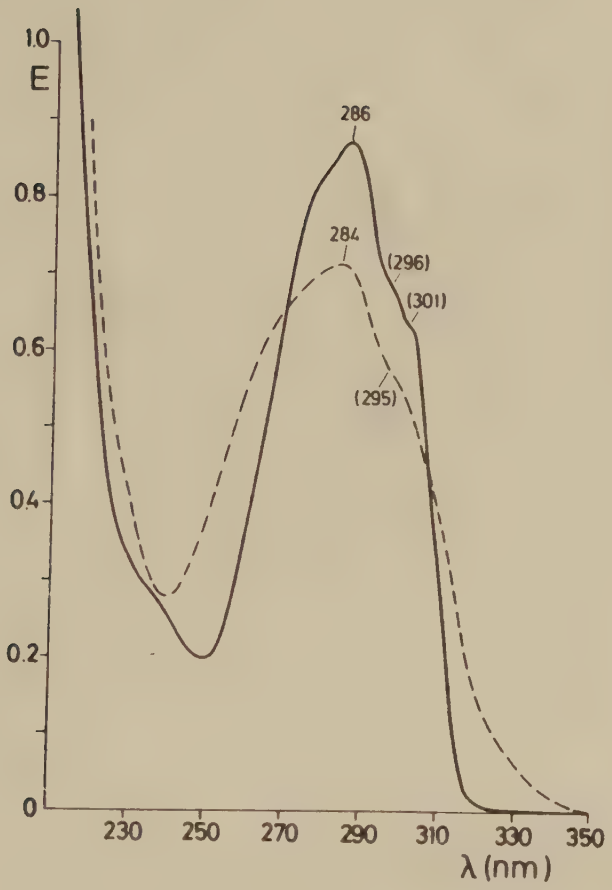


Abb. 8 : UV-Absorptionsspektrum von
2-Acetylaminofluoren-8ol
——— in neutralem Methanol
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

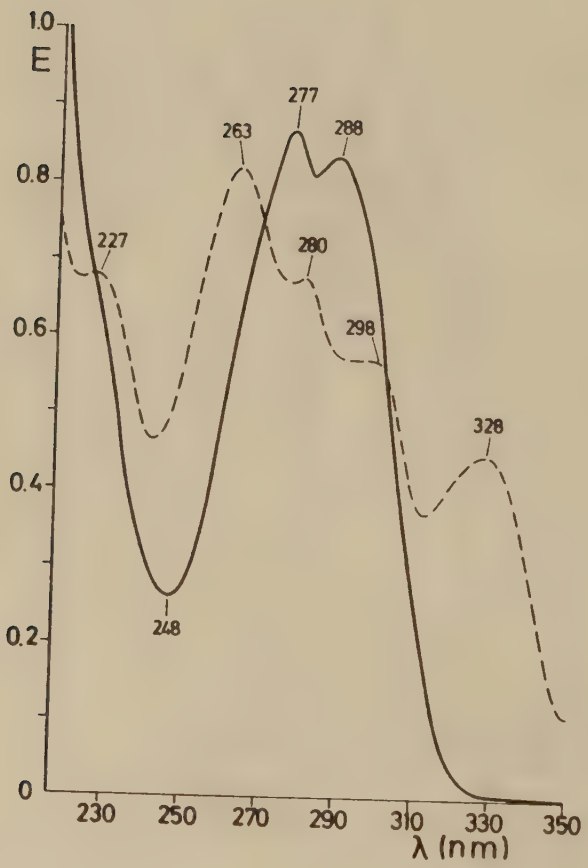


Abb. 9 : UV-Absorptionsspektrum von
2-Acetylaminofluoren-1ol
——— in neutralem Methanol (c = 0,007 mg/ml)
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

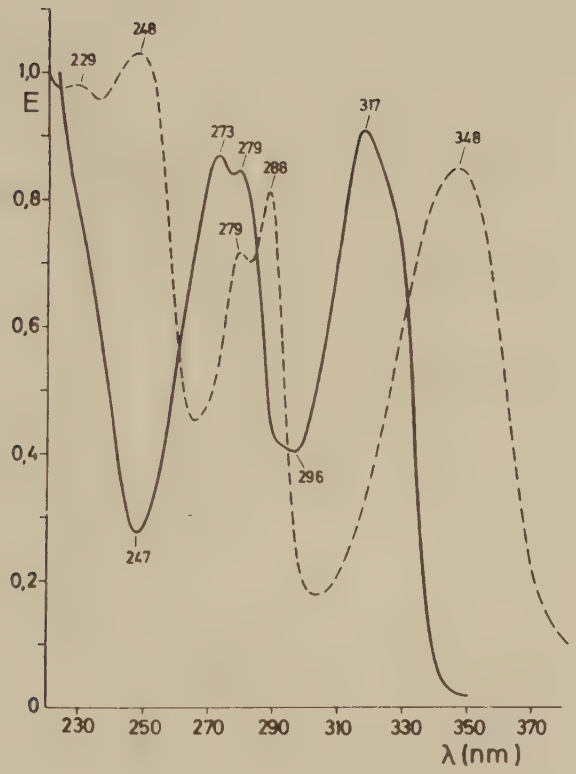
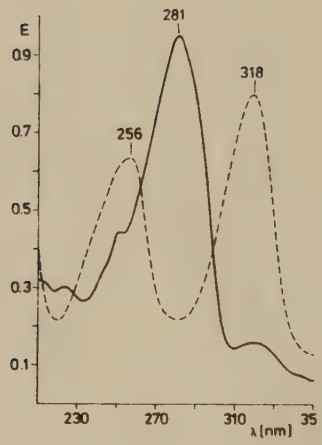


Abb. 10 : UV-Absorptionsspektrum von
2-Acetylaminofluoren-3ol
——— in neutralem Methanol (c = 0,009 mg/ml)
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH



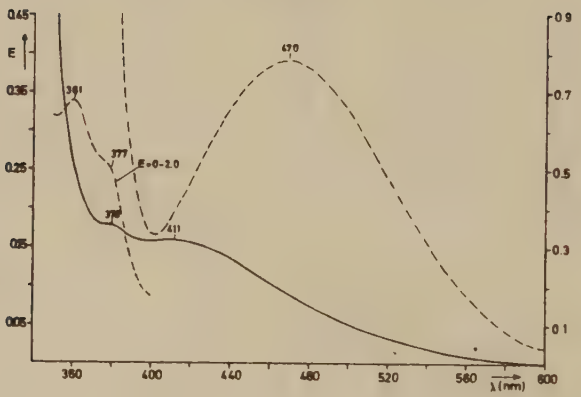


Abb. 11 : Elektronenspektrum von
2-Acetylaminofluoren-9on-3ol

UV-Bereich (350 - 220 nm) :
——— in neutralem Methanol (c = 0,0055 mg/ml)
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

Sichtbarer Bereich (600 - 350 nm) :
——— in neutralem Methanol (c = 0,055 mg/ml)
(linker Maßstab)
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH
(rechter Maßstab)

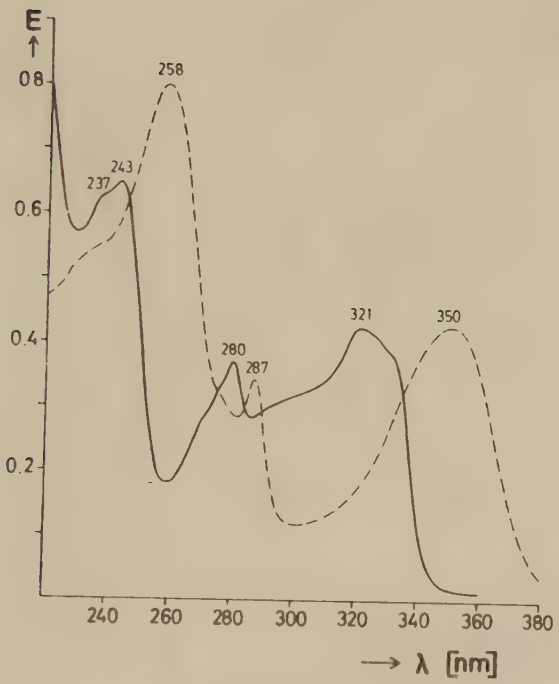
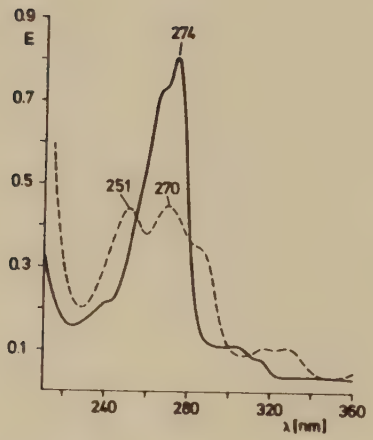


Abb. 12 : UV-Absorptionsspektrum von
2-Acetylaminofluoren-9.3-diol
——— in neutralem Methanol
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH



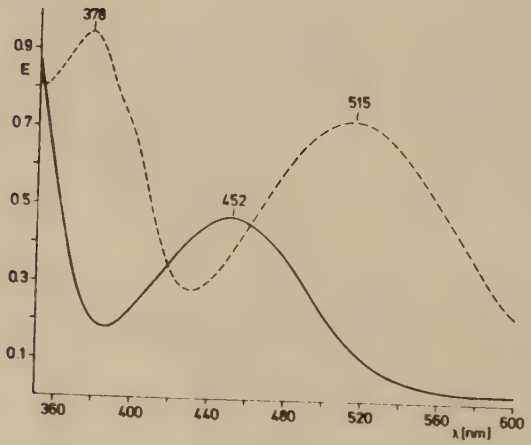


Abb. 13 : Elektronenspektrum von
2-Acetylaminofluoren-9on-5ol
——— in neutralem Methanol
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH
(oben : c = 0,004 mg/ml)
(unten : c = 0,102 mg/ml)

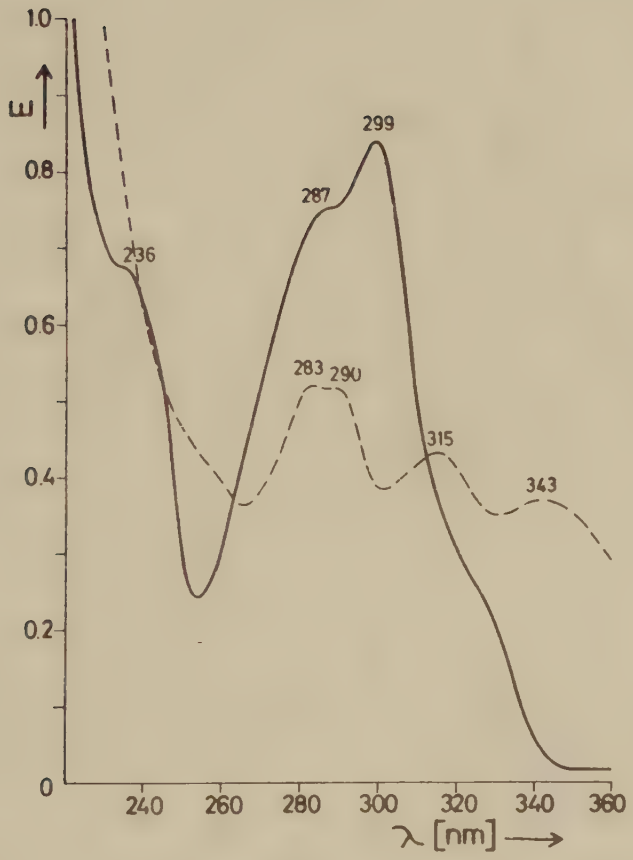
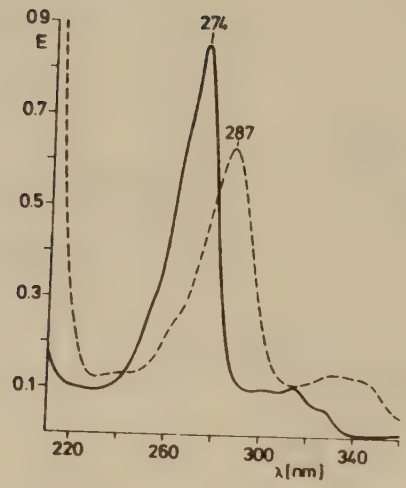


Abb. 14 : UV-Absorptionsspektrum von
2-Acetylaminofluoren-9.5-diol
——— in neutralem Methanol
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH



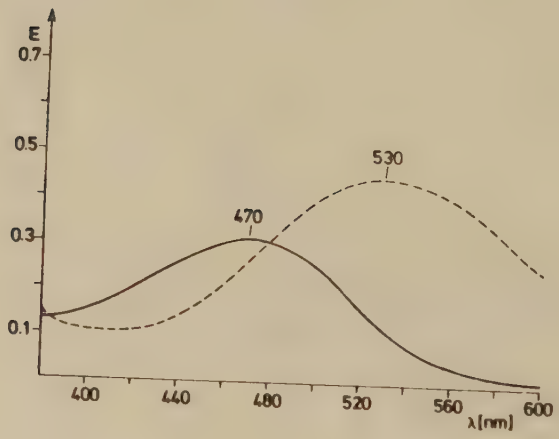


Abb. 15 : Elektronenspektrum von
2-Acetylaminofluoren-9on-7ol
——— in neutralem Methanol
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH
(oben : c = 0,006 mg/ml)
(unten : c = 0,103 mg/ml)

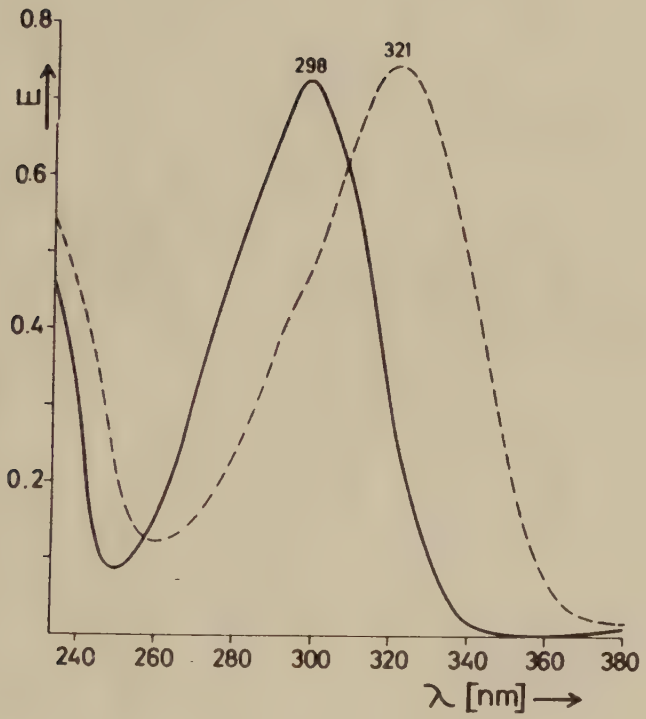


Abb. 16 : UV-Absorptionsspektrum von
2-Acetylaminofluoren-9.7-diol
——— in neutralem Methanol
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

Massen- und NMR-Spektren

von bekannten und neuen Derivaten

des 2-AAF

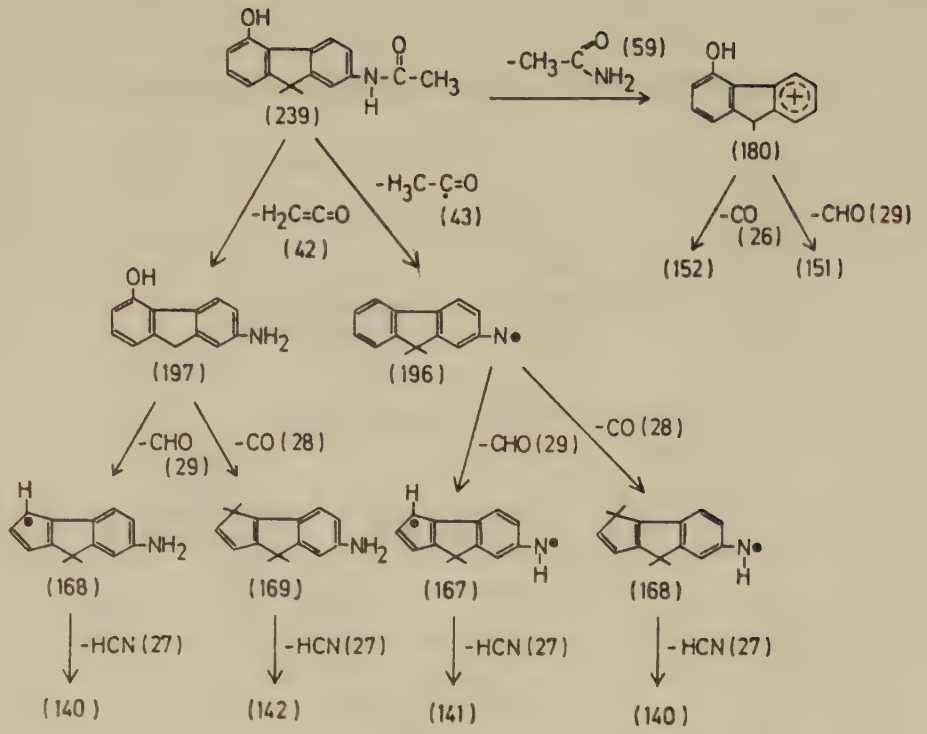


Fig.1: Massenspektrum von 2-AAF-5ol

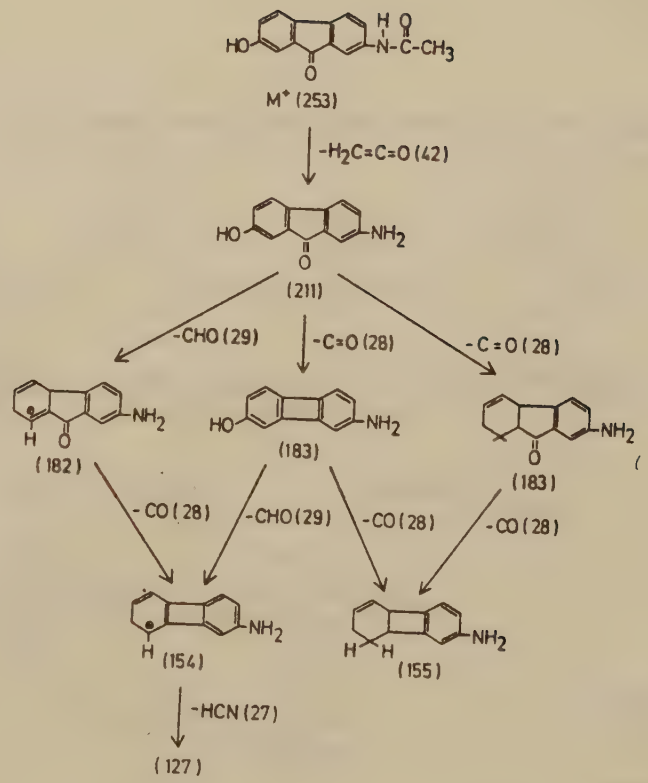


Fig. 2: Massenspektrum von 2-AAF-9on-7ol

Tab. 1 : NMR - Spektren in d_6DMSO, TMS : int.

Verbindung	Protonenresonanz (ppm)	Zuordnung
2-AAF-5ol	2,0 (3H/s)	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$
	3,86 (2H/s)	ar-$\underset{H\ H}{C}$-ar
	6,7 - 7,2 (3H)	6H, 7H, 8H
	7,5 (1H/dd; J = 8 Hz, J = 2 Hz)	3H (ABC; J = 9 Hz und 2 Hz)
	7,87 (1H)	1H
	8,02 (1H/d; J = 8 Hz)	4H
	9,85	NH
	9,94	OH
2-AAF-8ol	2,06 (3H/s)	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$
	3,74 (2H/s)	ar-$\underset{H\ H}{C}$-ar
	6,7 (1H/dd; J = 2 Hz, J = 7 Hz)	7H
	7,2 (2H/m)	6H und 5H

Verbindung	Protonenresonanz (ppm)	Zuordnung
2-AAF-8ol	7,5 (1H/dd; J = 2 Hz, J = 8 Hz)	3H
	7,7 (1H/d; J = 8 Hz)	4H
	7,9 (1H)	1H
	9,44 (1H/s)	OH
	9,9 (1H/s)	NH
2-AAF-1ol	2,18 (3H/s)	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$
	3,84 (3H/s)	ar-$\underset{H\ H}{C}$-ar
	7,2 - 7,9 (6H/m)	6 aromatische H
	9,8 (2H/s)	NH und OH
	austauschbar gegen D_2O	
2-AAF-3ol	2,13 s (3H)	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$
	3,77 s (2H)	ar-$\underset{H\ H}{C}$-ar
	7 - 7,8 (5H)	4H - 8H
	7,98 (1H)	1H

A B C

J = 8 Hz und 11 Hz

Verbindung	Protonenresonanz (ppm)	Zuordnung
2-AAF-3ol	9,3 (1H) (D_2O austauschbar)	-N-C- (O, H)
2-AAF-9on-3ol	2,13 (2H/s)	-C-CH_3 (O)
	7,18 (1H/s)	4H
	7,2 - 7,7 (4H/m)	5H - 8H
	8,14 (1H/s)	1H
	9,28 (1H) (langsam D_2O austauschbar) (15 Std.)	NH
2-AAF-9on-5ol (d_5-Pyridin)	2,2 (3H)	-C-CH_3 (O)
	7 - 7,5 (3H)	6H, 7H, 8H
	8,1 (1H/dd; J = 2 Hz, J = 9 Hz)	3H (ABC; J = 8 Hz und 1,5 Hz)
	8,2 (1H/d; J = 9 Hz)	4H

Verbindung	Protonenresonanz	Zuordnung
2-AAF-9on-5ol	8,5 (1H/d; J = 2 Hz)	5H
(d_5-Pyridin)	10,9 (1H)	OH
	(D_2O austauschbar)	
2-AAF-9on-7ol	2,08 (3H/s)	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$
	6,9 - 7,9 (6H)	6 Aromaten
	9,8 (1H)	NH
	(D_2O austauschbar)	
	10,5 (1H)	OH

2.2. Biologischer Teil

2.2.1. In Vitro - Versuche

2.2.1.1. mit 2-AAF als Substrat

Die Ergebnisse der in vitro-Versuche mit der mikrosomalen und löslichen Fraktion von Rattenleberhomogenat und 2-AAF als Substrat sind in Tab. 2, s. S. 50 und von Kaninchenleberhomogenat in Tab. 5, s. S. 53 zusammengestellt. Nichtidentifizierte Umwandlungsprodukte sind nicht in die Tabelle aufgenommen worden.
Danach wird 2-AAF durch Lebermikrosomen N-hydroxyliert, am Essigsäurerest und in 5-, 7- und 9-Stellung hydroxyliert. 2-AAF-9ol wird zu 2-AAF-9on dehydriert. Nach der Einführung des ersten Sauerstoffatoms in 9-Stellung wird ein zweites Sauerstoffatom in 5- und 7-Stellung eingesetzt, wodurch das Redoxpotential 2-AAF-9ol ⟷ 2-AAF-9on soweit erniedrigt wird, daß schon Luftsauerstoff die Dehydrierung von 2-AAF-9.5- bzw. 2-AAF-9.7-diol zu 2-AAF-9on-5ol bzw. 2-AAF-9on-7ol bewirkt.

Oxygenierung von 2-AAF in 9-Stellung: Die Bildung von 2-AAF-9ol und 2-AAF-9on

BENKERT et al. (25) beschrieben 2-AAF-9on und 2-AAF-9ol als neue Metaboliten des 2-AAF. Dabei fällt die Differenz zwischen der Bildungsgeschwindigkeit in vitro und den im Harn gefundenen Mengen auf. Die Frage, ob 2-AAF-9on aus 2-AAF-9ol gebildet werden kann, wurde in einem Experiment untersucht. Dabei wurde eine methanolische Lösung von 2-AAF-9ol in eine Küvette gegeben, ein UV-Spektrum geschrieben, anschliessend 24 Stunden mit Sauerstoff begast und wieder ein Spektrum geschrieben bzw. ein Dünnschichtchromatogramm angefertigt. Es ließ sich kein

2-AAF-9on nachweisen. Es ist demnach sehr wahrscheinlich, daß es sich bei der Umwandlung von 2-AAF-9ol in 2-AAF-9on um eine enzymatische Reaktion handelt.

2.2.1.2. mit 2-AAF-9on als Substrat

Die Ergebnisse der in vitro-Versuche mit der mikrosomalen und löslichen Fraktion von Rattenleberhomogenat und 2-AAF-9on sind in Tab. 4 (S. 52) und von Kaninchenleberhomogenat in Tab. 5 (S. 53) zusammengestellt.
Nichtidentifizierte Metabolite sind nicht in der Tabelle enthalten. 2-AAF-9on wird demnach durch mikrosomale und lösliche Enzyme der Leber N-hydroxyliert, am Essigsäurerest, in 7- und 3-Stellung hydroxyliert, an C-9 reduziert und, wenn die Acylamidasen nicht durch NaF blockiert werden, N-deacetyliert.

Reduktion von 2-AAF-9on zu 2-AAF-9ol in vitro und in vivo

Aus 2-AAF-9on entsteht sowohl in vitro durch die mikrosomale und lösliche Fraktion von Leberhomogenat als auch in vivo optisch aktives 2-AAF-9ol. Da 2-AAF-9ol durch dieselben Enzymfraktionen zu 2-AAF-9on dehydriert wird, liegt ein Redoxsystem vor. Da die methanolischen Lösungen des in vitro aus 2-AAF-9on gebildeten 2-AAF-9ol rechtsdrehend sind (Abb. 17, S. 55), liegt ein Gemisch der beiden Stereoisomeren vor, von denen die rechtsdrehende im Überschuß vorhanden ist. Die optische Ausbeute ließ sich jedoch nicht bestimmen, weil die optische Aktivität der reinen Antipoden nicht bekannt ist. Auch die Zuordnung des im Überschuß anwesenden Antipoden zu einer bestimmten Konfiguration des Asymmetriezentrums (R- oder S-Isomer) war aus dem gleichen Grunde nicht möglich. Danach enthält

sowohl die mikrosomale als auch die lösliche Fraktion von Leberhomogenat Enzyme (Reduktasen), die 2-AAF-9on stereoselektiv zum Carbinol reduzieren.

N-Hydroxylierung von 2-AAF-9on in vitro durch Kaninchenlebermikrosomen

2-AAF-9on wirkt in der Ratte carcinogen (9, 26). Ob wie bei 2-AAF dafür die N-Hydroxylierung verantwortlich ist, ist nicht bekannt. Über das metabolische Schicksal von 2-AAF-9on war zu Beginn dieser Untersuchungen nichts bekannt. 2-AAF-9on wird durch Kaninchenlebermikrosomen u.a. in eine Verbindung umgewandelt, die chromatographisch nicht von 2-AAF-9on zu unterscheiden ist und deren UV-Absorptionsspektrum größe Ähnlichkeit mit dem von 2-AAF-9on hat, im Gegensatz zu dem von 2-AAF-9on jedoch auf Zusatz von 2 M NaOH eine charakteristische Veränderung erfährt (s. Abb. 18). Ihre positive Farbreaktion mit $FeCl_3$ und die rasch verblassende Violettfärbung mit Echtblausalzlösung, Reaktionen, die ebenso von NOH-2-AAF gegeben werden, lassen vermuten, daß es sich bei dieser Verbindung um NOH-2-AAF-9on handelt. Diese Verbindung wurde nicht im Harn von Ratten gefunden, denen 2-AAF-9on injiziert worden war.

2.2.2. In Vivo - Versuche

2.2.2.1. mit einem Gemisch von NOH-2-AAF und [9-^{14}C]-2-AAF

Dünnschichtchromatographische Trennung der markierten Metabolite von 2-AAF im Rattenharn

Wie Fig. 5 zeigt, enthielt der Ätherextrakt mit den basischen und neutralen Metaboliten $(N\text{-}B)_2$ 2-Aminofluoren und 2-Acetylaminofluoren neben nicht identifizierten Umwandlungsprodukten. Tab. 6 zeigt, daß nur 8,8 mg 2-AAF, das sind 0,55 % der applizierten Dosis, der Metabolisierung entgangen sind.

Von dem Ätherextrakt (S_2), der die sauren, ätherlöslichen Umwandlungsprodukte enthielt, wurde ein aliquoter Teil auf Celluloseplatten chromatographiert, um NOH-2-AAF zu isolieren und quantitativ zu bestimmen (s. Fig. 6).

Der restliche Extrakt (S_2) wurde auf Kieselgelplatten getrennt (s. Fig. 7), um die übrigen Metabolite zu isolieren. Das Ergebnis, s. Tab. 6, zeigt, daß neben den bekannten sauren Umwandlungsprodukten, wie 2-AAF-1ol, -3ol, -5ol und -7ol auch die bisher unbekannten 2-AAF-9on-3ol, 2-AAF-9on-5ol und 2-AAF-9.5-diol sowie ein bisher nicht identifizierter Metabolit (s. weiter unten) gefunden wurden. Überraschend war das Auffinden von 2-AAF und 2-AAF-9ol in dieser Stoffklasse. Aus einem anderen Versuch, der hier nicht beschrieben wird, stammte 2-AAF-9on-7ol.

N-Hydroxylierung von [9-^{14}C]-2-AAF im Meerschweinchen

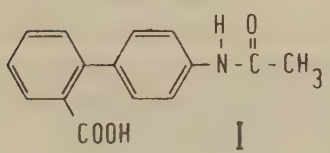
Meerschweinchen schieden in den ersten 24 Stunden nach i.p.-Injektion eines Gemisches von NOH-2-AAF und [9-^{14}C]-2-AAF (Dosis: 50 mg/kg) 0,3 x 10^9 dpm ^{14}C, das sind 29 % der applizierten Radioaktivität, mit dem Harn aus. Nach 6-stündiger Inkubation des Harns mit β-Glucuronidase wurde mit 1,5 l Äther extrahiert und das im Ätherextrakt enthaltene NOH-2-AAF rein dargestellt. Die Gesamtmenge (nichtmarkiertes und markiertes)NOH-2-AAF wurde zu 19 mg, das sind 0,83 % der applizierten Dosis, bestimmt. Die Messung der Radioaktivität ergab 0,2 x 10^9 dpm, das ist 0,02 % der applizierten Radioaktivität, d.h., nur jedes 5555. Molekül 2-AAF wird im Meerschweinchen N-hydroxyliert.

N-Hydroxylierung von [9-^{14}C]-2-AAF in der Ratte

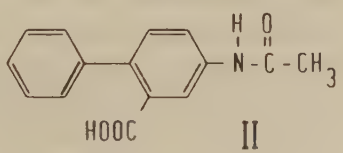
Männliche und weibliche Ratten schieden in den ersten 24 Stunden nach i.p.-Injektion eines Gemisches von NOH-2-AAF und [9-^{14}C]-2-AAF (Dosis: 50 mg/kg) 0,32 x 10^9 dpm ^{14}C, das sind 29 % der applizierten Radioaktivität, mit dem Harn (1060 ml) aus (s. Tab. 6). Nach 6-stündiger Inkubation bei pH 6.8 mit β-Glucuronidase und 12-stündiger Inkubation bei pH 5.2 mit β-Glucuronidase-Arylsulphatase wurde der Harn mit Äther extrahiert und NOH-2-AAF in den vereinigten Ätherauszügen bestimmt. Die Gesamtmenge (nichtmarkiertes und markiertes NOH-2-AAF) wurde zu 61,5 mg, das sind 3,8 % der applizierten Dosis, bestimmt; die Messung der Radioaktivität ergab 0,18 x 10^9 dpm, das sind 1,6 % der applizierten Radioaktivität, d.h., jedes 62. Molekül 2-AAF wird in der Ratte N-hydroxyliert. Damit ist die Geschwindigkeit der N-Hydroxylierung in der Ratte 88-mal schneller als im Meerschweinchen.

Suche nach den isomeren Acetylaminobiphenylsäuren im Rattenharn

WEISBURGER et al. (1) hatten vermutet, daß etwa gebildetes 2-AAF-9on unter Ringöffnung in die beiden isomeren Acetylaminobiphenylsäuren (I und II) übergehen könnte, ohne ihre Vermutung jedoch experimentell stützen zu können.



I



II

Um den Rattenharn auf Anwesenheit der isomeren Acetylaminobiphenylcarbonsäuren prüfen zu können, mußten die beiden isomeren Säuren synthetisiert und charakterisiert werden.

An der Stelle im Dünnschichtchromatogramm des Essigesterextraktes, an der sie aufgrund des R_f-Wertes der authentischen Säuren hätten erscheinen sollen, befand sich auch eine radioaktive Zone, deren UV-Spektrum aber nicht mit dem der authentischen Verbindung identisch war.
Das Ergebnis der Verlustbestimmung (s. Methodischer Teil) zeigt, daß von 3,26 mg des Isomeren I in 300 ml Harn nur ein sehr kleiner Teil wiedergefunden wurde (0,31 %); 3,26 mg entsprechen 0,18 % der applizierten Dosis 2-AAF. Da aber die isomeren Acetylaminobiphenylcarbonsäuren im Harn nicht entdeckt wurden, muß der Anteil der Dosis 2-AAF, der unter Ringöffnung in die isomeren Biphenylcarbonsäuren überführt wird (wenn überhaupt), kleiner als 0,18 % sein.

2-AAF-9on-5ol, ein neuer Metabolit von 2-AAF in vivo und in vitro

Das-UV-Absorptionsspektrum der in dieser Zone absorbierten Verbindung, deren R_f-Wert kleiner war als der von 2-AAF-7ol, stimmte zwar in neutralem Methanol mit dem von 2-AAF-9on überein, zeigte aber im Gegensatz zu dem von 2-AAF-9on auf Zusatz von 2 M NaOH eine charakteristische Änderung des Kurvenverlaufs. Die Vermutung lag nahe, daß es sich um ein phenolisches Hydroxyderivat des 2-AAF-9on handeln könnte. Die gelbliche Farbe der methanolischen Lösung und das dafür verantwortliche Absorptionsmaximum bei λ = 452 nm, das auf Zusatz von 2 M NaOH nach λ = 515 nm verschoben wurde, stützte die Annahme, daß es sich um ein phenolisches Monohydroxyderivat des 2-AAF-9on handeln könnte.
Da mit diesen geringen Mengen nicht zu klären war, in welcher Position des 2-AAF-9ons sich die phenolische Hydroxygruppe befindet, wurde Ratten 2-AAF-9on injiziert, in der Hoffnung, im Harn größere Mengen dieses Metaboliten zu entdecken. Tatsächlich wurde diese Verbindung aus dem Harn in größeren Mengen isoliert (in festem Zustand

rot) und mit Hilfe ihres NMR-Spektrums als 2-AAF-9on-5ol identifiziert. Bei einem Vergleich der chromatographischen und spektroskopischen Eigenschaften des aus Harn isolierten Metaboliten mit der synthetischen Verbindung ergab sich völlige Übereinstimmung (s. Abb. 19). Damit war gezeigt, daß 2 Sauerstoffatome nacheinander in 2-AAF eingesetzt werden können (sekundäre Oxygenierung).

Suche nach anderen phenolischen Monohydroxyderivaten von 2-AAF-9on in vivo und in vitro

Nach der Entdeckung von 2-AAF-9on-5ol lag die Vermutung nahe, daß das primäre Oxygenierungsprodukt 2-AAF-9on oder 2-AAF-9ol auch noch an anderen Positionen des aromatischen Grundgerüstes hydroxyliert werden könnte. Da 2-AAF in der Ratte in 1-, 3-, 5- und 7-Position oxygeniert wird, war anzunehmen, daß diese Positionen auch im 2-AAF-9on oxygeniert werden könnten.
Daher wurden diese noch nicht beschriebenen Verbindungen synthetisiert, um mit ihrer Hilfe ihr Auffinden im Harn von Ratten zu erleichtern. Tatsächlich fanden sich an den durch den authentischen Vergleich gekennzeichneten Stellen im DS-Chromatogramm auch radioaktive Zonen, deren Inhaltsstoffe dasselbe UV-Absorptionsspektrum zeigten wie die Vergleichssubstanzen. So wurden 2-AAF-9on-7ol und 2-AAF-9on-3ol als weitere Metabolite und sekundäre Oxygenierungsprodukte von 2-AAF identifiziert (s. Abb. 20 und 21).

Eine andere Art der sekundären Oxygenierung von 2-AAF: Isolierung und Eigenschaften eines neuen pehnolischen Dihydroxyderivates von 2-AAF

Wie Fig. 7 zeigt, befand sich unter den radioaktiven Zonen des Dünnschichtchromatogramms auch eine, deren R_f-Wert kleiner war als der von 2-AAF-7ol. Die UV-Absorptionskurve des Methanol-Eluats ist in Abb. 22 wiedergegeben. Dieselbe Verbindung wurde auch in dem Versuch mit nichtmarkiertem 2-AAF sowohl frei als auch in konjugierter Form gefunden, und sie wurde auch in

größerer Konzentration bei der Aufarbeitung des Harns von Ratten entdeckt, denen 2-AAF-7ol injiziert worden war. Das läßt Rückschlüsse auf die Genese dieses Metaboliten zu. Man kann nämlich annehmen, daß ein Teil des 2-AAF-7ol in der Ratte weiter oxidiert wurde, wobei eine zusätzliche Hydroxygruppe in eine zunächst unbekannte Position des Fluorengerüstes eingeführt wurde. Das Ergebnis ist ein Acetylaminofluoren mit 2 phenolischen Hydroxygruppen, von denen sich die eine in 7-Stellung befindet und die Stellung der anderen nicht bekannt, jedenfalls nicht die 9-Stellung ist, denn 2-AAF-9.7-diol ist ja in dieser Arbeit beschrieben. Infrage kommen die 1-, 3- und 5-Stellung, von denen der 3-Stellung wegen gemeinsamer struktureller Besonderheiten ihrer UV-Absorptionsspektren der Vorzug gegeben wird (s. Abb. 22).
Eine Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Massenspektrometrie ergab $\frac{m}{e}$ = 255 (s. Fig. 8), womit die Konstitution eines Dihydroxyderivates von 2-AAF bewiesen ist. Sekundäre Oxygenierung von 2-AAF kann demnach auch dadurch stattfinden, daß eine Hydroxygruppe zuerst in 1-, 3-, 5- oder 7-Stellung und eine zweite danach in eine der übrigen freien Positionen eintritt. Da phenolische Dihydroxyderivate von 2-AAF aber in der Literatur nicht beschrieben sind, muß für den endgültigen Konstitutionsbeweis die Synthese abgewartet werden.
Außerdem wurde aus einer Zone mit noch kleinerem R_f-Wert ein noch stärker polares Derivat des 2-AAF beobachtet, dessen UV-Absorptionsspektrum in Abb. 23 wiedergegeben ist. Die fehlende Strukturierung, die Ähnlichkeit des Neutralspektrums mit dem von 2-AAF-7ol und der geringe Effekt von 2 M NaOH auf das UV-Absorptionsspektrum lassen vermuten, daß es sich um ein 2-AAF-7.8-diol handelt.

2.2.2.2. mit nichtmarkiertem 2-AAF

Chromatographische Trennung der nichtmarkierten Metabolite von 2-AAF

Die orientierenden Vorversuche mit ^{14}-C-markiertem 2-AAF haben gezeigt, welche Methoden angewendet werden müssen, um die Metabolite von 2-AAF zu trennen. Diese Erfahrungen gestatteten eine rasche Wiederholung des Versuchs, der mit nichtmarkiertem 2-AAF ausgeführt wurde. Der 24 Stunden nach der i.p.-Injektion von 50 mg/kg ausgeschiedene Harn von Ratten wurde ohne Veränderung des pH mit Chloroform, dann bei pH 5.0 mit Essigester und nach Inkubation mit ß -Glucuronidase-Arylsulphatase ein zweitesmal mit Essigester extrahiert, um zwischen freien und konjugierten Metaboliten unterscheiden zu können. Das Ergebnis der Chromatographie der drei Extrakte ist in den Fig. 9, 10 und 11 dargestellt.

Monohydroxyderivate im Harn von Ratten nach i.p.-Injektion von 2-AAF

Neben den bekannten Monohydroxyderivaten 2-AAF-3ol, -5ol und -7ol wurde die Anwesenheit von 2-AAF-8ol eindeutig bewiesen (s. Abb. 24). Dem für eine chromatographische Trennung ungünstigen Mischungsverhältnis von 2-AAF-7ol : 2-AAF-8ol = 100 : 1 ist es zuzuschreiben, daß der chromatographische Nachweis von 2-AAF-8ol so schwierig ist. Ein spektroskopischer Nachweis der Anwesenheit einer kleinen Menge von 2-AAF-8ol in einem großen Überschuß von 2-AAF-7ol ist aus dem gleichen Grunde nicht möglich.

Wenn das Verhältnis 2-AAF-7ol : 2-AAF-6ol und 2-AAF-8ol : 2-AAF-4ol ebenso ungünstig oder sogar noch ungünstiger ist, dann ist verständ-

lich, warum 2-AAF-6ol und 2-AAF-4ol (wenn überhaupt vorhanden) bisher noch nicht entdeckt wurden.
Obwohl im Chromatogramm eine Zone mit dem R_f-Wert von 2-AAF-1ol vorhanden war, enthielt sie doch nicht die Verbindung, die in diesem Versuch nicht gefunden wurde.

Dihydroxyderivate im Harn von Ratten nach i.p.-Injektion von 2-AAF (sekundäre Oxygenierung von 2-AAF)
Dank der authentischen Dihydroxyderivate 2-AAF-9.7-, 9.5- und 9.3-diol gelang es, 2-AAF-9.5- und 9.7-diol in größeren Mengen sowohl in freier als auch in konjugierter Form im Harn nachzuweisen. Dagegen wurde 2-AAF-9.3-diol, das am wenigsten polare Dihydroxyderivat, nur in freier Form im Chloroformextrakt entdeckt (s. Abb. 25, 26 und 27).
Bemerkenswert ist, daß von diesen Dihydroxyderivaten nur 2-AAF-9.5-diol in dem Versucht mit markiertem 2-AAF beobachtet wurde. Das läßt den Schluß zu, daß sie instabil sind und bei längerer Aufarbeitung in stabilere Verbindungen umgewandelt werden.
Außer diesen Dihydroxyderivaten des 2-AAF wurden noch zwei andere phenolische Hydroxyderivate gefunden, deren Identifizierung noch nicht gelang und die oben (2.2.1.1.) beschrieben sind.

2-Acetylaminofluoren-9on-3ol, -5ol und -7ol, stabile Endprodukte der sekundären Oxygenierung von 2-AAF
Von den drei Monohydroxyderivaten des 2-AAF-9ons, die in dem Versuch mit markiertem 2-AAF gefunden wurden (s. 2.2.1.1.), wurde hier nur 2-AAF-9on-5ol beobachtet. Die Erklärung für die abweichenden Ergebnisse ist, daß wegen der langen Dauer der Vorversuche die oxidationsempfindlichen 2-AAF-9.(3, 5, 7)-diole in die stabilen 2-AAF-9on-(3, 5, 7)-ole umgewandelt wurden, während sie im zügig durchgeführten Versuch mit nichtmarkiertem 2-AAF praktisch unverändert isoliert wurden.

Zur Biogenese der phenolischen Monohydroxyderivate des 2-AAF-9ons

Nachdem entdeckt worden war, daß 2-AAF-9on-3ol, 2-AAF-9on-5ol und 2-AAF-9on-7ol über die entsprechenden 2-AAF-9.(3, 5, 7)-diole unter Mitwirkung des Luftsauerstoffs gebildet werden, interessierte, ob diese Dihydroxyderivate durch sekundäre Oxygenierung von 2-AAF-9ol bzw. 2-AAF-9on oder von 2-AAF-7ol, -5ol und -3ol entstehen. Da 2-AAF-7ol das am leichtesten zugängliche Monohydroxyderivat von 2-AAF ist (im Kaninchen ist 2-AAF-7ol der Hauptmetabolit von 2-AAF), wurde es Ratten in verschiedenen Dosen appliziert. Im Harn dieser Tiere wurde aber weder nach kleinen noch nach großen Dosen (100 mg/kg) 2-AAF-7ol, 2-AAF-9.7-diol oder 2-AAF-9on-7ol entdeckt, statt dessen das Diol (s. oben) in größerer Menge als nach Gabe von 2-AAF. Damit ist gezeigt, daß ein 2-AAF, das in 7-Stellung oxygeniert worden ist, nicht mehr in 9-Stellung, wohl aber noch in anderer Position oxygeniert werden kann. Man muß daher annehmen, daß die 2-AAF-9-(3, 5, 7)-diole ihre Entstehung einer primären Oxygenierung an C-9 und einer sekundären Oxygenierung an C-7, C-5 oder C-3 verdanken.

Eine Übersicht über das Ergebnis dieser Arbeit und die Ergebnisse früherer Arbeiten zur Biotransformation von 2-AAF gibt Fig. 12.

2.2.2.3. mit 2-AAF-9on

Umwandlungsprodukte von 2-AAF im Harn von Ratten nach i.p.-Injektion dieser Verbindung

Ratten schieden nach i.p.-Injektion von 50 mg 2-AAF-9on/kg diese Verbindung praktisch vollständig metabolisiert mit dem Harn aus, in dem nur ein kleiner Rest unverändert wiedergefunden wurde. Die identifizierten Umwaldungsprodukte sind schematisch in Fig. 13 dargestellt. Danach

wird der größte Teil der applizierten Dosis zu optisch aktivem 2-AAF-9ol reduziert, welches das Hauptumwandlungsprodukt von 2-AAF-9on ist. Ein kleiner Teil wird N-deacetyliert und ausgeschieden, ein anderer Teil in verschiedenen Positionen oxygeniert. Identifiziert wurden 2-AAF-9.5-diol, 2-AAF-9.7-diol und die entsprechenden 2-AAF-9on-ole, außerdem 2-AAF-9on-3ol. Bemerkenswert, daß 2-AAF-9on sowohl durch Mikrosomen in vitro als auch in der Ratte in kleiner Ausbeute in eine Verbindung umgewandelt wird, deren UV-Absorptionsspektrum in Abb. 28 dargestellt ist. Aufgrund einer versuchten Synthese von 2-AAF-9on-6ol, die eine kleine Menge einer Verbindung mit einem identischen UV-Absorptionsspektrum ergab, wird angenommen, daß es sich um das 2-AAF-9on-6ol handelt. Für den Konstitutionsbeweis muß aber die Synthese abgewartet werden.

Tabellen, Abbildungen und Figuren

zu den Ergebnissen

des Biologischen Teils

Tab. 2 : Biotransformation von 2-AAF in vitro durch verschiedene Fraktionen von Rattenleberhomogenat

Anzahl	Induktion	mg Prot./ml	ml	Ansatz	GAF (mg)	2-AAF-9on (mg)	2-AAF-9ol (mg)	2-AAF-7ol (mg)	sonstige Metabolite
a) mit der mikrosomalen Fraktion									
16 ♂	3 MCh	1 mg/ml			0,14	0,026	1,0992	0,670	2-AAF-3ol: 0,280 mg
30 ♂	3 MCh	1 mg/ml	100	NADH	0,036	0,199	0,438		
				NADH		0,204	0,416		
18 ♀		3 mg/ml	200			0,0296	0,207		
27 ♂		3 mg/ml	200			0,043			2-AAF-6ol-9on
									2-AAF-7ol-9on
b) mit dem 105 000 xg - Überstand									
15 ♂		3 mg/ml	200		0,0572	0,0958	3,746		
27 ♂		3 mg/ml	200	o.NaF +0,4mMNA	0,325	0,985		0,986	2AF: 1,606 mg Z_3 unbekannt

Tab. 3 : Biotransformation von 2-AAF in vitro durch verschiedene Fraktionen von Kaninchenleberhomogenat mit der mikrosomalen Fraktion

Anzahl	Induktion	mg Prot./ml	ml Ansatz	GAF (mg)	2-AAF-9on (mg)	2-AAF-9ol (mg)	NOH-2-AAF (mg)	2-AAF-7ol (mg)	sonstige Metabolite
12 ♀	3 MCh		200	0,163	0,263	0,342	1,097	1,807	2-AAF-5ol: 0,423 mg 2-AAF-5ol-9on: 0,165 mg
5 ♂	3 MCh	3 mg/ml		0,607	0,517	0,443	2,058	1,617	
10 ♀	3 MCh	3 mg/ml		0,424	0,104		1,683	0,946	unbek. Amin: 2-AF-9ol

Tab. 4 : Biotransformation von 2-AAF-9on in vitro durch verschiedene Fraktionen von Rattenleberhomogenat

Anzahl	Induktion	mg Prot./ml	ml Ansatz	GAF (mg)	2-AAF-9on (mg)	2-AAF-9ol (mg)	2-AAF-7ol (mg)	sonstige Metabolite
a) mit der mikrosomalen Fraktion								
27 ♂		3 mg/ml	2 x 100			17,406		2-AAF-6ol-9on n.q. 2-AAF-7ol-9on: 0,038 mg
b) mit dem 105 000 xg - Überstand								
27 ♂		3 mg/ml	2 x 100 o.NaF +0,4mMNA			4,864		

Tab. 5 : Biotransformation in vitro von 2-AAF-9on durch verschiedene Fraktionen von Kaninchenleberhomogenat

Anzahl	Induktion	mg Prot./ml	ml Ansatz	GAF-9on (mg)	2-AAF-9ol (mg)	2-AAF-NOH (mg)	2-AAF-7ol (mg)	sonstige Metabolite
a) mit der mikrosomalen Fraktion								
12 ♂	3 MCh	3 mg/ml	100	0,373	0,485	n.q.	0,108	
5 ♂	3 MCh	3 mg/ml	200	0,648	1,913	n.q.	0,469	2-AAF-6ol-9on n.q.
10 ♀	3 MCH	3 mg/ml	200	0,750	0,906	n.q.	0,588	2-AAF-6ol-9on n.q. 2-AAF-9on 0,071
	3 MCh	3 mg/ml	2 x 100	0,753	0,662		0,947	2-AAF-6ol-9on 2-AAF-7ol-9on 2-AAF-3ol-9on
	PB	3 mg/ml	2 x 100	0,2447	3,917		0,58	2 unbek. Metabolite 2-AAF-6ol-9on
	PB	3 mg/ml	2 x 100	0,583	9,264	n.q.	0,272	
b) mit dem 105 000 xg - Überstand								
12 ♂	3 MCh	3 mg/ml	100		11,949			

Tab. 6 : Ausscheidung von radioaktiv markierten Metaboliten von 2-AAF im Harn von männlichen und weiblichen Ratten nach i.p.-Injektion eines Gemisches von NOH-2-AAF und [9-^{14}C]-2-AAF (50 mg/kg)

Applizierte Mischung : 1600 mg NOH-2-AAF und 11 mg [9-^{14}C]-2-AAF, gelöst in 32 ml Olivenöl.

Gesamtmenge applizierter Radioaktivität: 0,5 mC = $1{,}1 \cdot 10^9$ dpm

Harn (0 - 24 Std.) (1060 ml)	$0{,}32 \cdot 10^9$	= 29 %
saure Frakt.	$0{,}2 \cdot 10^9$	= 18 %
bas./neutr. Frakt.	$0{,}012 \cdot 10^9$	= 1 %
Restakt.	$0{,}068 \cdot 10^9$	= 6 %
Verlust	$0{,}042 \cdot 10^9$	= 3,8 %

Neutralfraktion (basische und neutrale Metabolite) :

AAF	$0{,}02 \cdot 10^9$	= 1,8 %	8,8 mg	=	0,55 %
AF	$0{,}02 \cdot 10^9$	= 1,8 %	5,75 mg	=	0,35 %

Saure Fraktion (saure Metabolite) :

	Aktivität	% Dosis
2-AAF-7ol	$0{,}0586 \cdot 10^9$ = 5,3 %	31 mg = 1,9 %
2-AAF-9on-7ol	$0{,}0008 \cdot 10^9$ = 0,07 %	0,26 mg = 0,016 %
2-AAF-5ol	$0{,}049 \cdot 10^9$ = 4,4 %	29,75 mg = 1,85 %
2-AAF-9on-5ol	$0{,}006 \cdot 10^9$ = 0,5 %	4,9 mg = 0,3 %
2-AAF-3ol	$0{,}006 \cdot 10^9$ = 0,54 %	9,3 mg = 0,5 %
2-AAF-9on-5ol	$0{,}0003 \cdot 10^9$ = 0,02 %	0,3 mg = 0,018 %
2-AAF-1ol	$0{,}007 \cdot 10^9$ = 0,63 %	0,325 mg = 0,018 %
NOH-2-AAF	$0{,}018 \cdot 10^9$ = 1,6 %	61,5 mg = 3,8 %

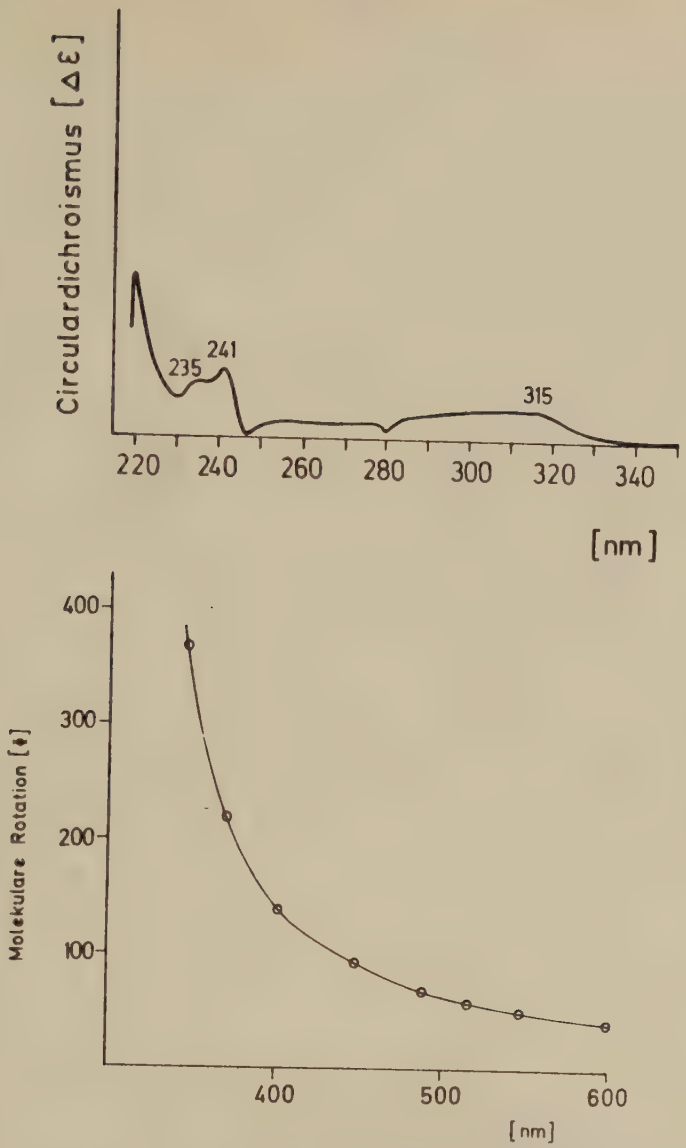


Abb. 17 : oben: CD - Spektrum von 2-AAF-9ol
unten: ORD- Spektrum von 2-AAF-9ol
isoliert aus dem Harn von Ratten,
denen 2-AAF-9on i.p. injiziert
wurde

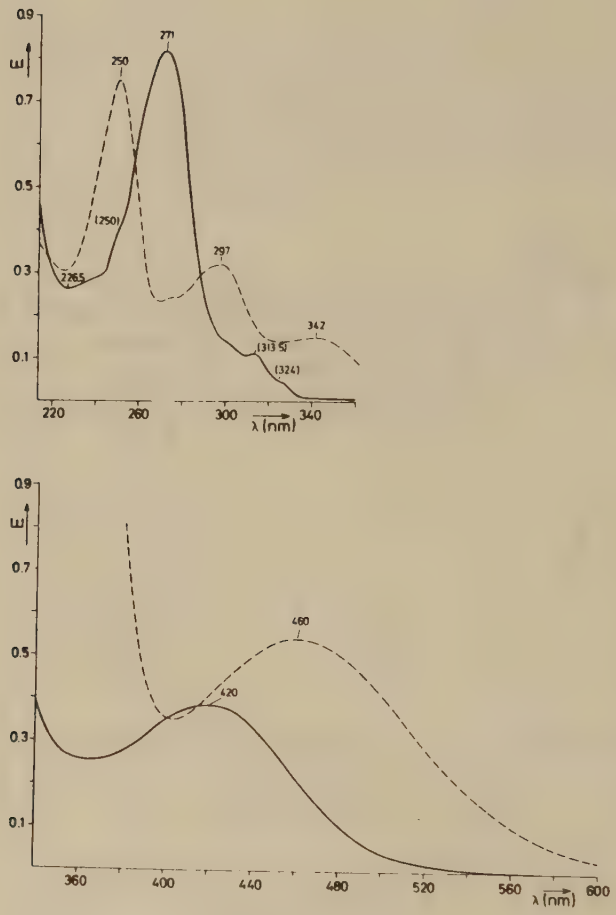


Abb. 18 : Elektronenspektrum
eines unbekannten Metaboliten von
2-AAF-9on durch Kaninchenlebermikrosomen
in vitro gebildet, vermutlich N-Hydroxy-
2-Acetylaminofluoren-9on
——— in neutralem Methanol
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

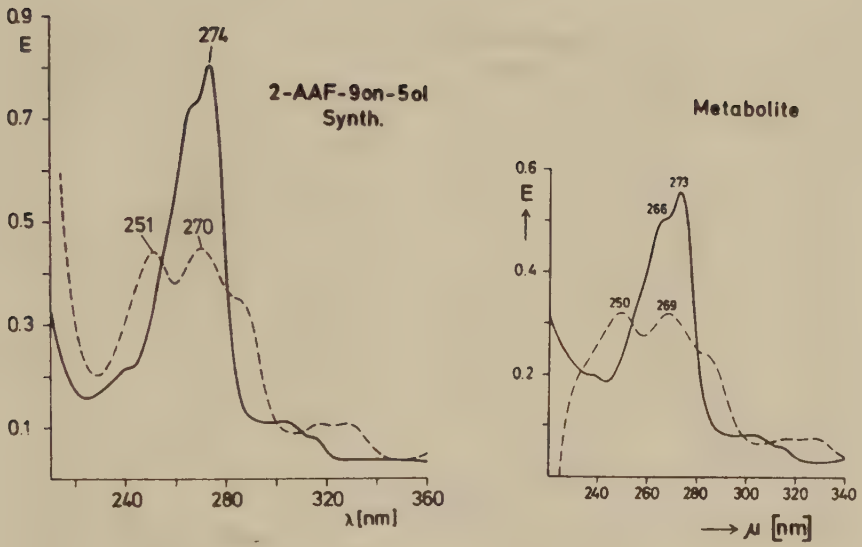


Abb. 19 : UV-Absorptionsspektrum von 2-Acetylaminofluoren-9on-5ol synth. und dem radioaktiven Metaboliten aus Rattenharn

——— in neutralem Methanol

----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

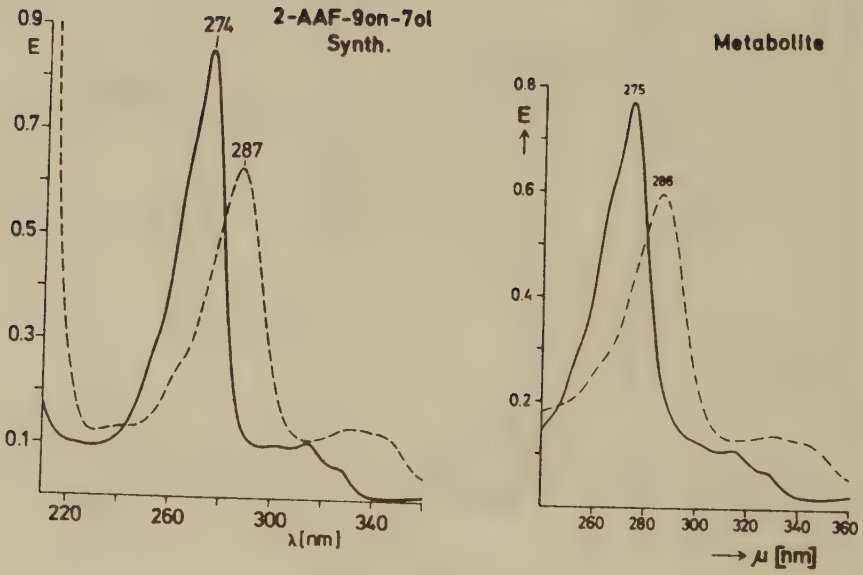


Abb. 20 : UV-Absorptionsspektrum von 2-Acetylaminofluoren-9on-7ol synth. und dem aus Rattenharn isolierten radioaktiven Metaboliten

——— in neutralem Methanol

----- Zusatz vin 0,05 ml 2 M NaOH

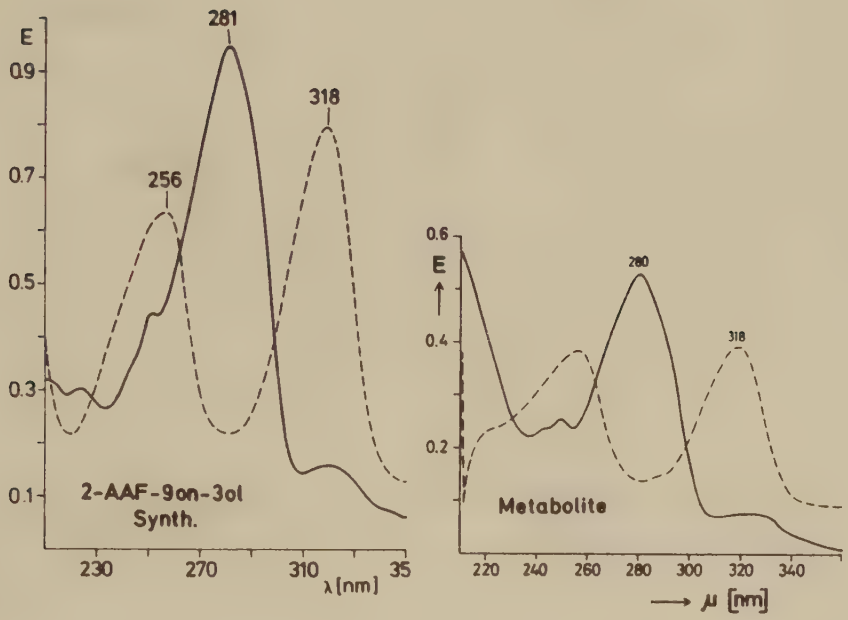


Abb. 21 : UV-Absorptionsspektrum von 2-Acetylaminofluoren-9on-3ol synth. und dem aus Rattenharn isolierten radioaktiven Metaboliten

——— in neutralem Methanol

----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

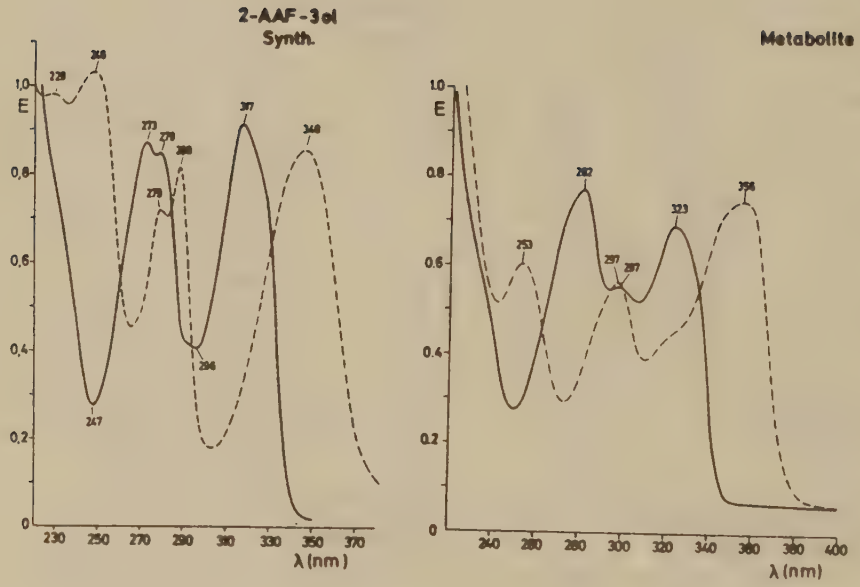


Abb. 22 : UV-Absorptionsspektrum von 2-Acetylaminofluoren-3ol synth. und einem polaren radioaktiven Metaboliten von 2-AAF, vermutlich 2-Acetylamino-3.7-diol

——— in neutralem Methanol

----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

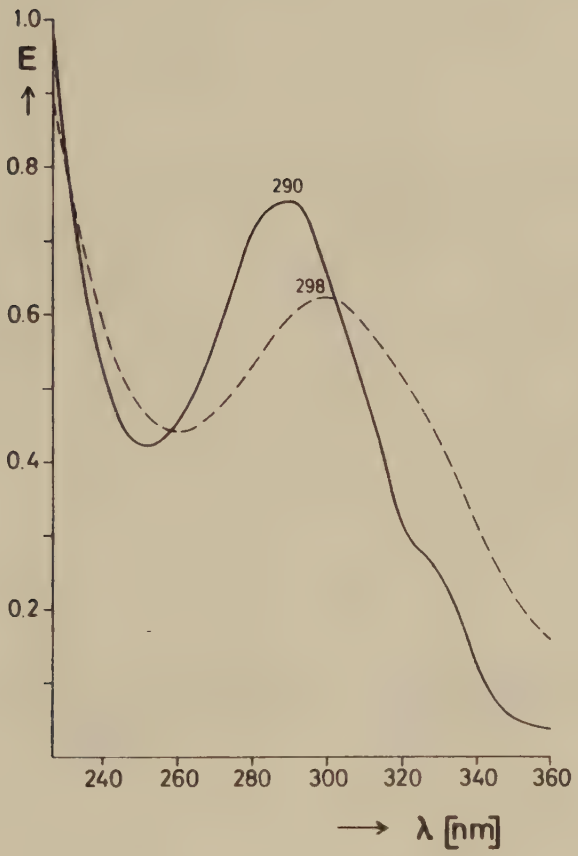


Abb. 23 : UV-Absorptionsspektrum
eines polaren radioaktiven Metaboliten
von 2-AAF, vermutlich 2-AAF-7.8-diol
——— in neutralem Methanol
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

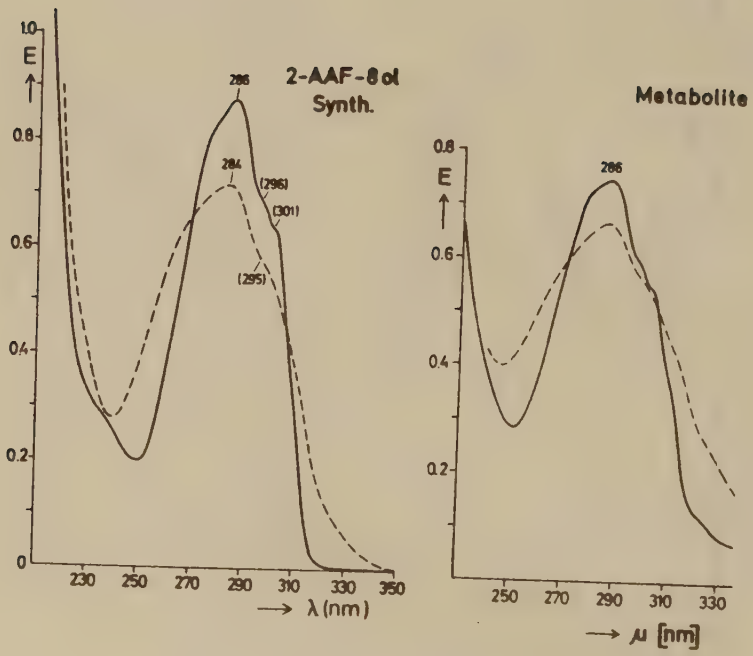


Abb. 24 : UV-Absorptionsspektrum von 2-Acetylaminofluoren-8ol synth. und dem aus Rattenharn isolierten Metaboliten mit gleichem R_f-Wert

——— in neutralem Methanol

----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

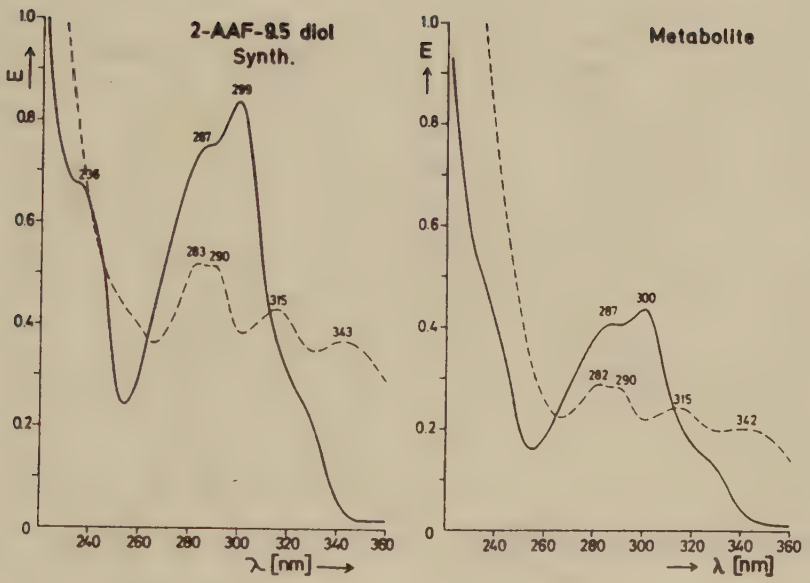


Abb. 25 : UV-Absorptionsspektrum von 2-Acetylaminofluoren-9.5-diol synth. und dem aus Rattenharn isolierten Metaboliten mit gleichem R_f-Wert

——— in neutralem Methanol

----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

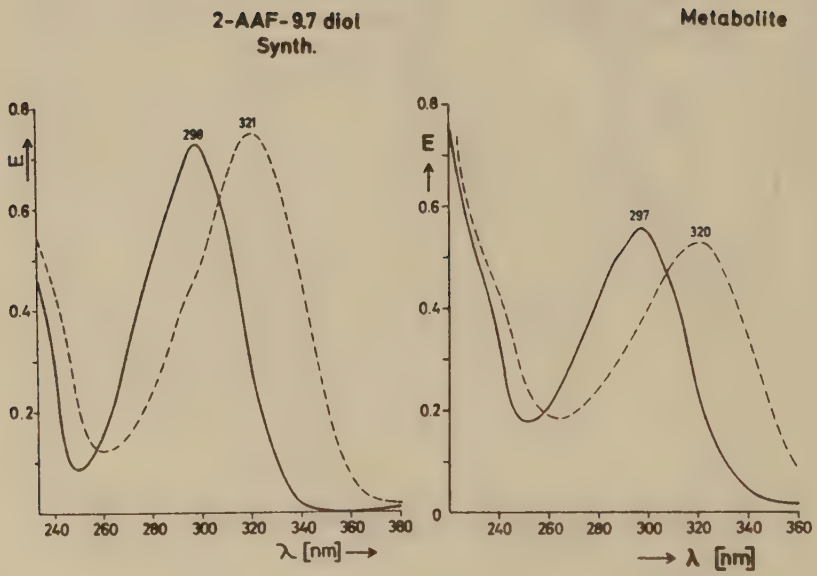


Abb. 26 : UV-Absorptionsspektrum von 2-Acetylaminofluoren-9.7-diol synth. und dem aus Rattenharn isolierten Metaboliten mit gleichem R_f-Wert

——— in neutralem Methanol

----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

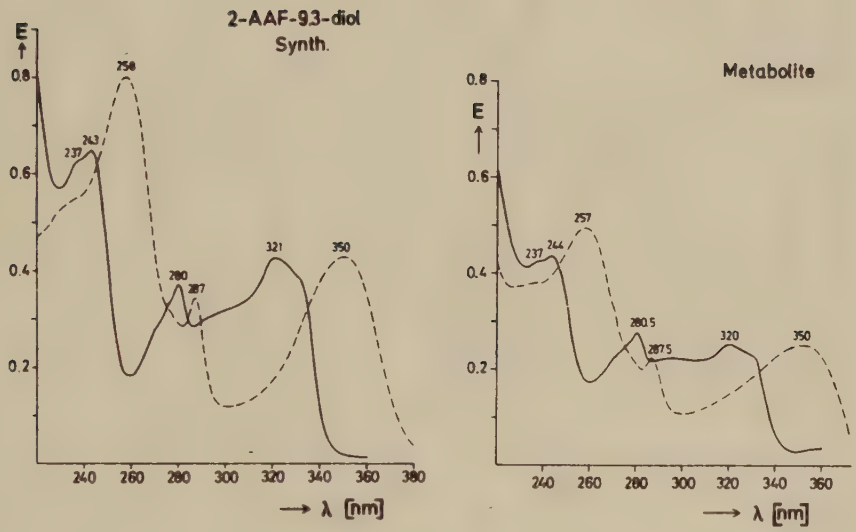


Abb. 27 : UV-Absorptionsspektrum von 2-Acetylaminofluoren-9.3-diol synth. und dem aus Rattenharn isolierten Metaboliten mit gleichem R_f-Wert

——— in neutralem Methanol

----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

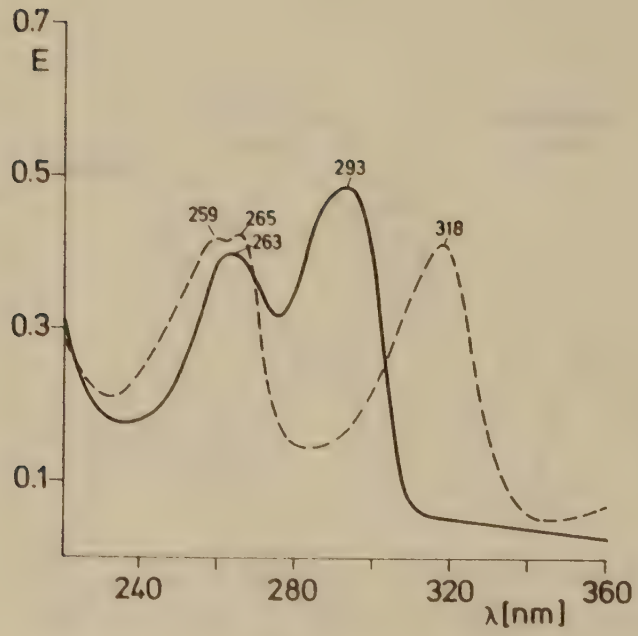


Abb. 28 : UV-Absorptionsspektrum
eines unbekannten Metaboliten von
2-AAF-9on (in vitro und in der Ratte),
vermutlich 2-Acetylaminofluoren-9on-6ol
——— in neutralem Methanol
----- Zusatz von 0,05 ml 2 M NaOH

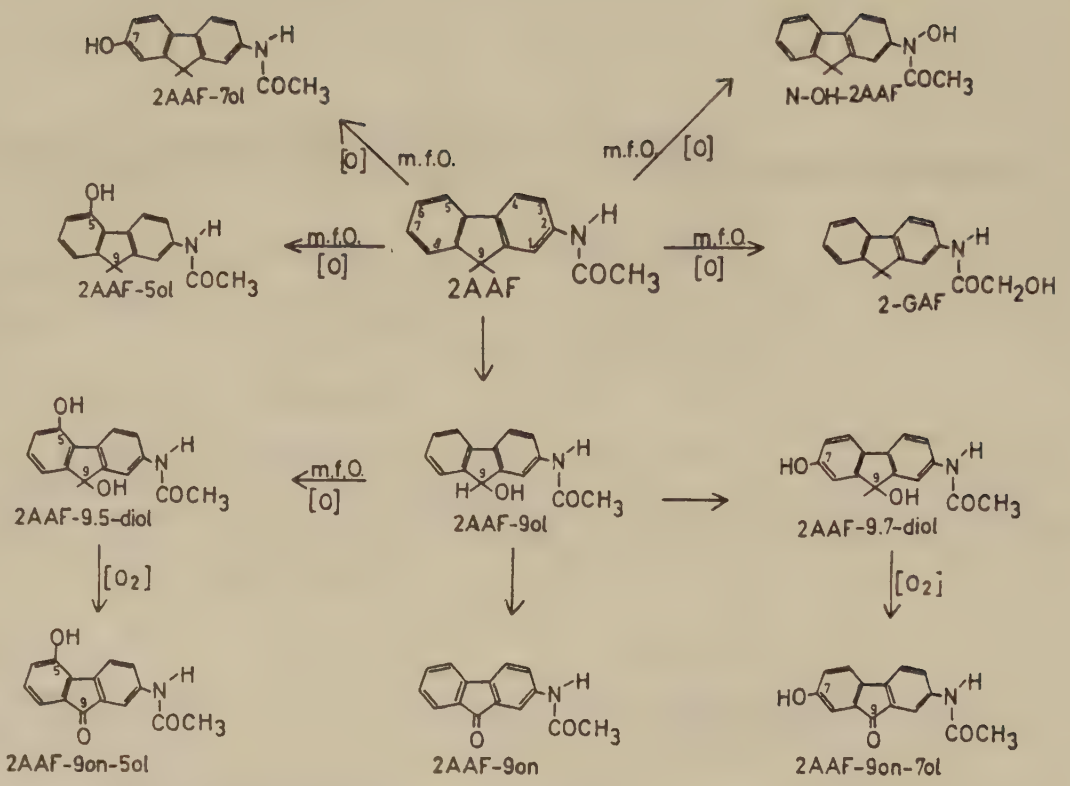


Fig. 3.: Biotransformation von 2-AAF in vitro durch Kaninchenlebermikrosomen: Identifizierte Umwandlungsprodukte.

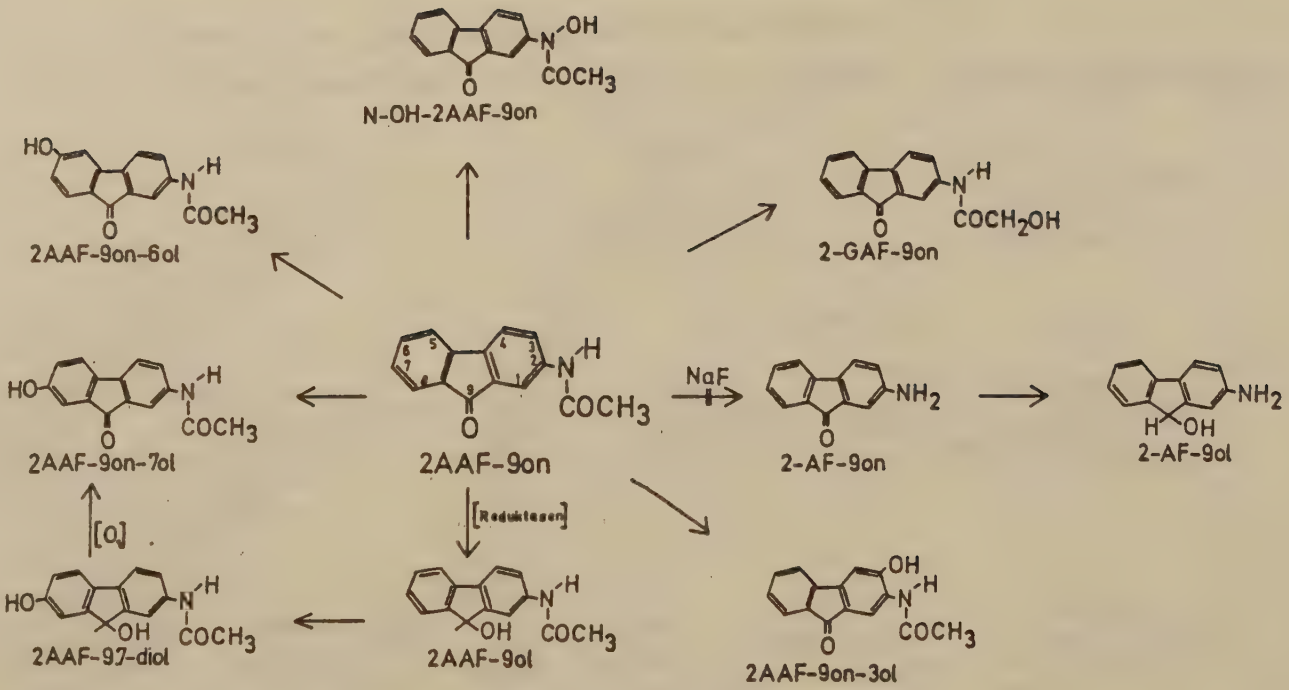


Fig. 4.: Biotransformation von 2-AAF-9on in vitro durch Kaninchenleber-mikrosomen: Identifizierte Umwandlungsprodukte.

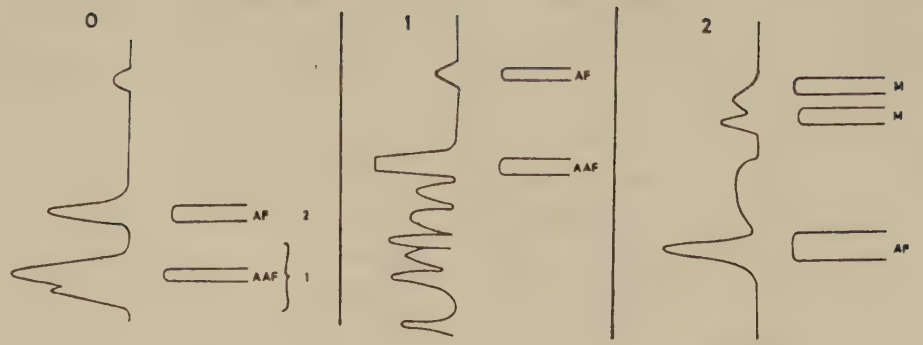


Fig. 5 : DS-chromatographische Trennung der neutralen und basischen Metabolite aus dem kombinierten Ätherextrakt des 24 Stunden nach i.p.-Injektion von NOH-2-AAF und [^{14}C]-2-AAF ausgeschiedenen Harns.
DC-Fertigplatten 60 Kieselgel F_{254}; Fließmittel 0 : B, 1 : B, 2 : A
M = Metabolit von 2-AAF U = Physiologischer Harnbestandteil

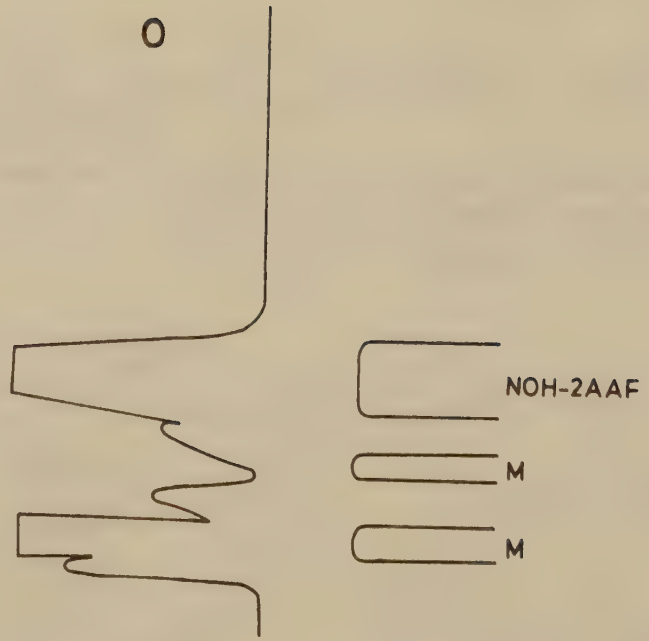


Fig. 6 : DS-chromatographische Trennung von NOH-2-AAF aus dem kombinierten Ätherextrakt des 24 Stunden nach i.p.-Injektion von NOH-2-AAF und [^{14}C]-2-AAF ausgeschiedenen Harns.
DC Fertigplatten Cellulose F; Fließmittel : C

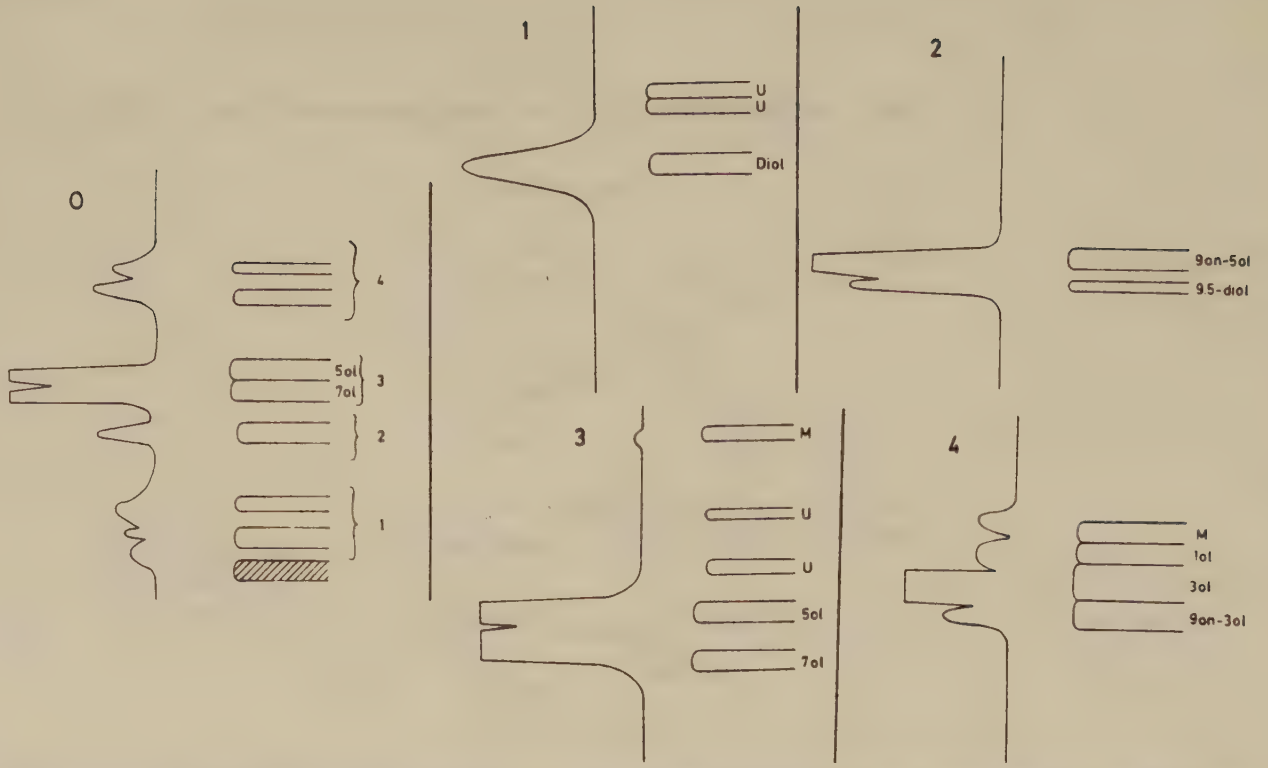


Fig. 7 : DS-chromatographische Trennung der sauren Metabolite aus dem kombinierten Ätherextrakt des 24 Stunden nach i.p.-Injektion von NOH-2-AAF und [^{14}C]-2-AAF ausgeschiedenen Harns. DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254}; Fließmittel 0 : E, 1 : G, 2 : H, 3 : H, 4 : A

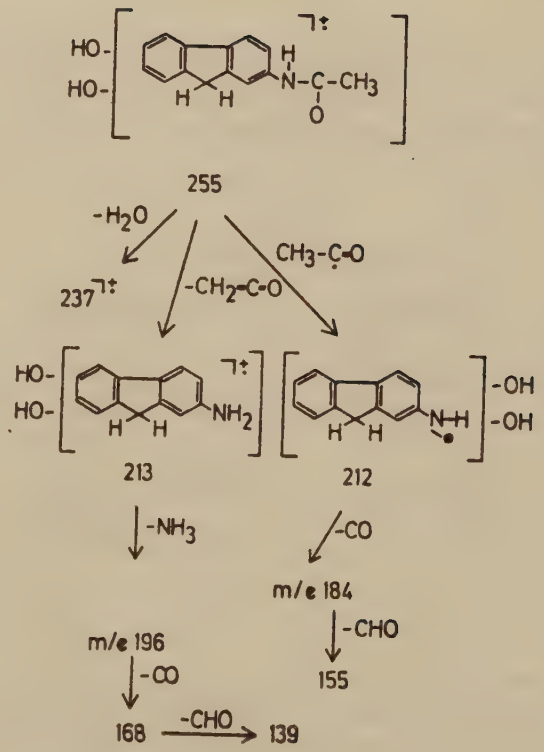


Fig.8.: Massenspektrum vom unbekannten Diol von 2-AAF

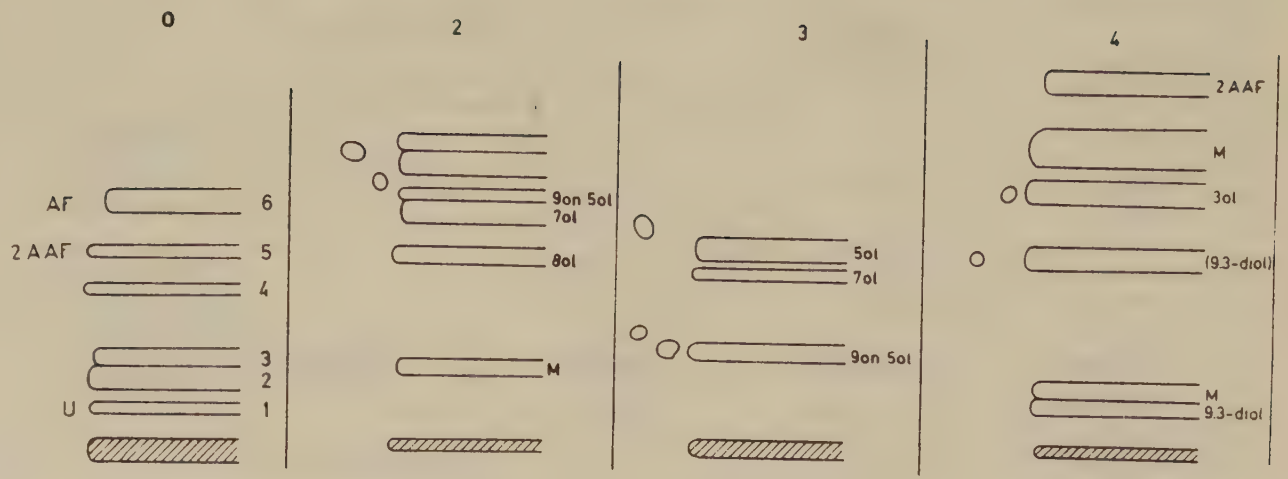


Fig. 9 : DS-chromatographische Trennung des Chloroformextraktes des 24 Stunden-Harns ohne Veränderung des pH (9.3).
0 : Chloroformextrakt; 2, 3, 4 : Zonen von 0 rechromatographiert.
DC-Fertigplatten 60 Kieselgel F_{254}; Fließmittel: 0 : H, 2-4 : D

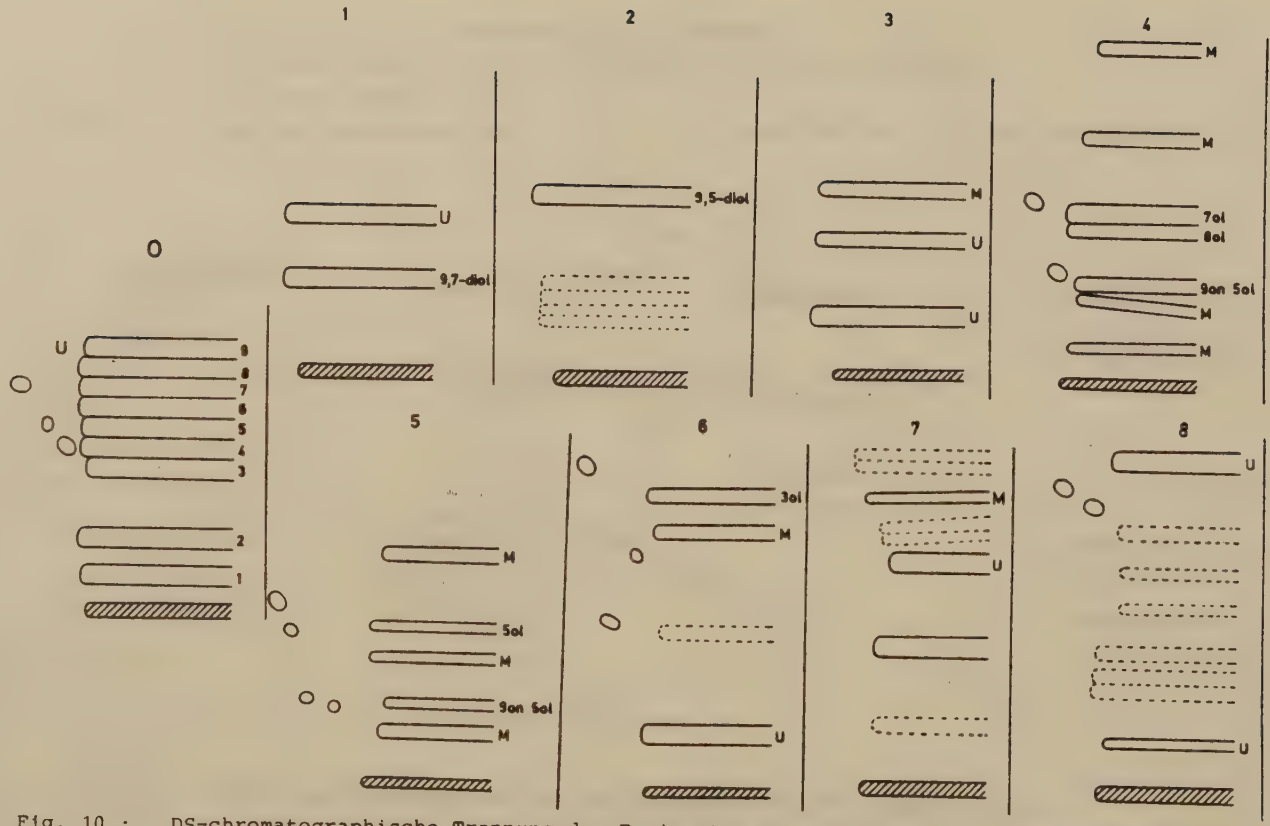


Fig. 10 : DS-chromatographische Trennung des Essigesterextraktes des 0 - 24 Stunden-Harns nach Einstellen des pH auf 5.2.

0 : Essigesterextrakt; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 : Zonen von 0 rechromatographiert.

DC-Fertigplatten 60 Kieselgel F_{254}; Fließmittel: 0 : I, 1-8 : D

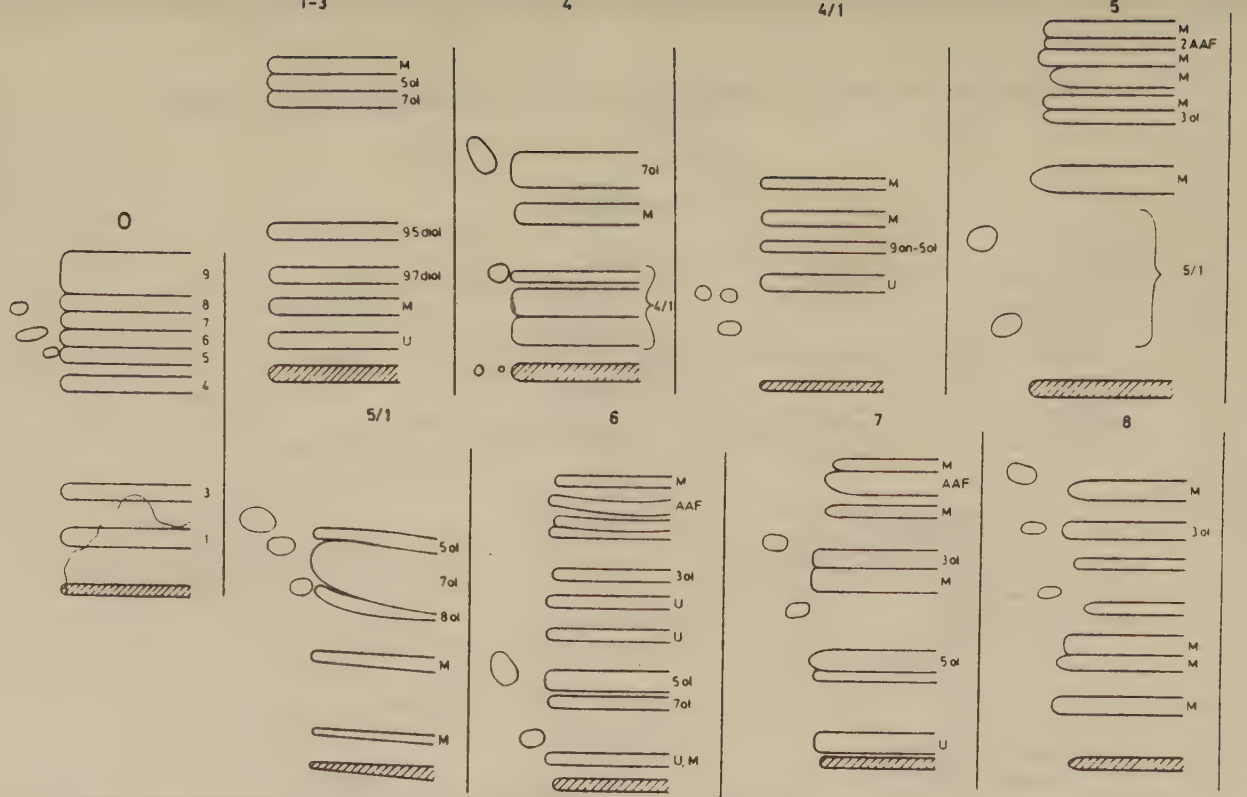


Fig. 11 : DS-chromatographische Trennung des Essigesterextraktes des 0 - 24 Stunden-Harns nach Inkubation mit -Glucuronidase-Arylsulfatase.
0 : Essigesterextrakt; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 : Zonen von 0 rechromatographiert.
DC-Fertigplatten 60 Kieselgel F_{254}; Fließmittel: 0:I, 1-3:I, 4:D, 4/1:I, 5-8:D

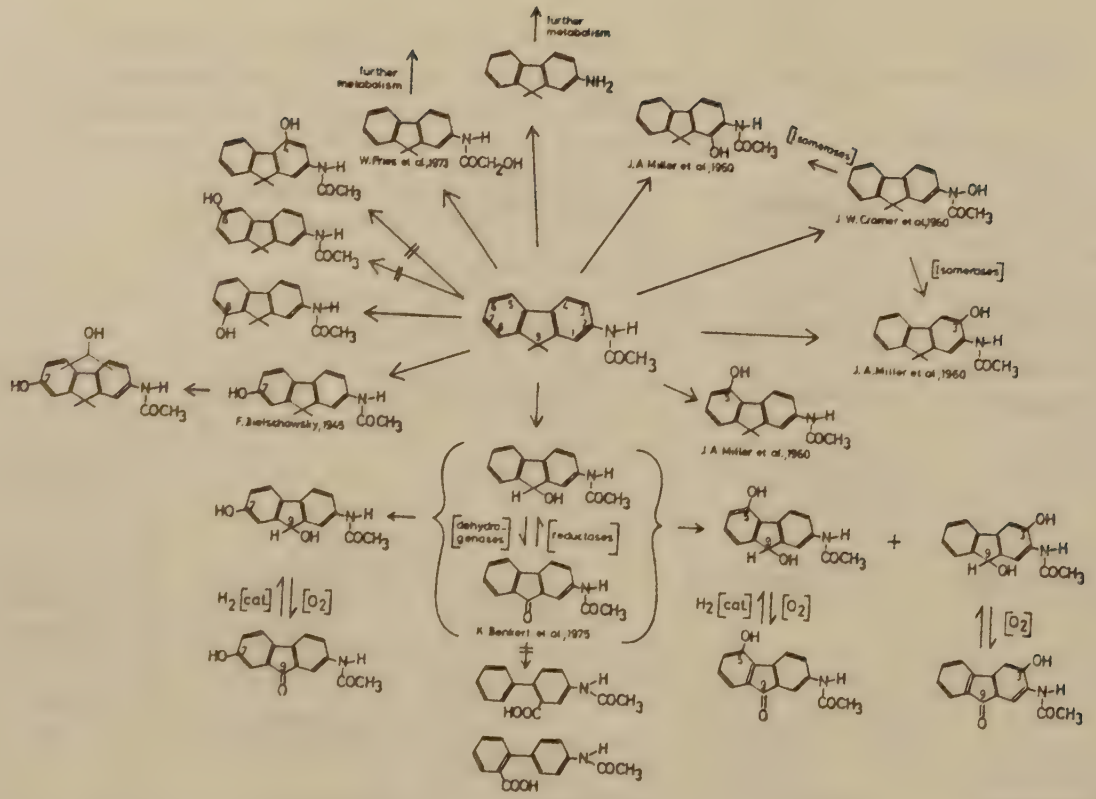


Fig. 12.: Biotransformation des Carcinogens 2-AAF in der Ratte.

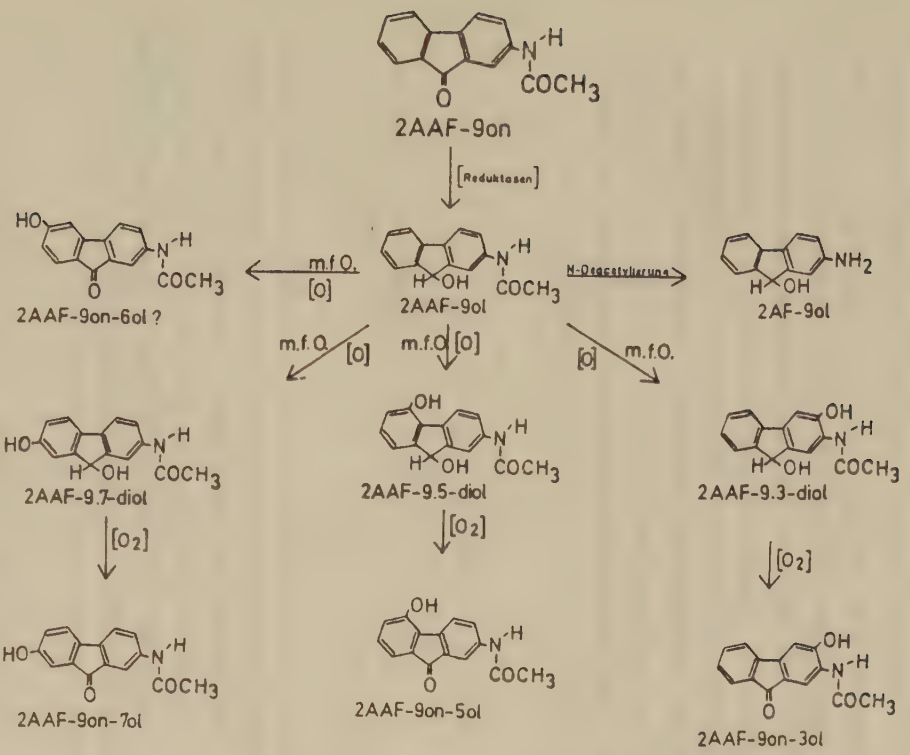
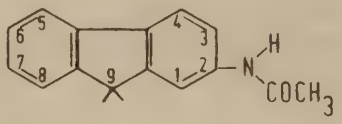


Fig. 13.: Biotransformation von 2-AAF-9on in der Ratte: Identifizierte Umwandlungsprodukte.

3. DISKUSSION

WEISBURGER et al., die die Biotransformation von 2-AAF untersucht haben, haben mit Hilfe der umgekehrten Isotopenverdünnungsmethode ausgeschlossen, daß 2-AAF-9ol ein Metabolit in der Ratte ist (2, 32, 33). Die Untersuchungen von BENKERT et al. (25) haben dagegen gezeigt, daß auch das Kohlenstoffatom in 9-Stellung des Fluorens (s. Abb.) durch Lebermikrosomen von Kaninchen und Meerschweinchen in vitro oxygeniert wird und Spuren von 2-AAF-9ol auch im Harn von Ratten nach i.p.-Injektion von 2-AAF gefunden werden.
Neben 2-AAF-9ol wurden wechselnde Mengen seines Dehydrierungsproduktes, 2-AAF-9on, beobachtet.



An diesen Ergebnissen fiel auf, daß viel kleinere Mengen der an C-9 oxygenierten Derivate im Harn bestimmt wurden, als aufgrund der in vitro gemessenen Oxygenierungsgeschwindigkeit zu erwarten waren. Das legte die Vermutung nahe, daß 2-AAF-9ol oder 2-AAF-9on auf unbekannten Stoffwechselwegen weiter oxydiert werden und nur ein kleiner Rest der weiteren Umsetzung entgeht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen und bestätigen, daß 2-AAF-9ol und 2-AAF-9on durch die mikrosomale und die lösliche Fraktion von Ratten- und Kaninchenleberhomogenaten gebildet werden und daß 2-AAF-9on durch diese Enzymfraktion zu optisch aktivem 2-AAF-9ol reduziert wird, ein weiteres Beispiel für die Stereoselektivität der membrangebundenen und löslichen Reduktasen. Durch die

Dehydrierung des 9-Carbinols und die Reduktion des 9-Ketons entsteht ein Redoxsystem, von dem in letzter Zeit einige Beispiele bekannt wurden, so 3-Oxohexobarbital ⟷ 3-Hydroxyhexobarbital (34), 1-Indanon ⟷ 1-Indanol (35) und (ω-1)-Oxofettsäuren ⟷ (ω -1)-Hydroxyfettsäuren (36).

Durch die Einführung eines Sauerstoffatoms in die 9-Stellung des Fluorens wird aber das eigentliche Ziel, die Generation eines stärker hydrophilen oder weniger lipophilen Moleküls nicht erreicht, denn 2-AAF-9ol wird sehr leicht in 2-AAF-9on umgewandelt und dieses unterscheidet sich in seiner Lipophilie kaum von 2-AAF. Das Ziel, ein stärker hydrophiles Derivat, wird erst durch die Einsetzung eines zweiten Sauerstoffatoms erreicht (sekundäre Oxygenierung) (37, 38).
Als neue Metabolite von 2-AAF wurden 2-AAF-9.5-, -9.7.- und -9.3-diol aus dem Harn von Ratten isoliert, mit dem sie frei und konjugiert ausgeschieden wurden.
Aufgrund des niedrigen Redoxpotentials genügt Luftsauerstoff, um 2-AAF-9.7-diol zu 2-AAF-9on-7ol, 2-AAF-9.5-diol zu 2-AAF-9on-5ol und 2-AAF-9.3-diol zu 2-AAF-9on-3ol zu dehydrieren. So wird verständlich, daß bei langsamer Aufarbeitung des Harns oder von Harnextrakten der Anteil der 2-AAF-9on-(3, 5, 7)-ole auf Kosten der 2-AAF-9-(3, 5, 7)-diole zunimmt, während bei zügiger Aufarbeitung kaum 2-AAF-9on-ole, dafür größere Mengen des 2-AAF-9.7- und -9.5-diol gefunden wurden. Die gleichen Metabolite wurden im Harn von Ratten gefunden, denen 2-AAF-9on appliziert worden war.

Es führt aber noch ein anderer Weg zu sekundären Oxygenierungsprodukten von 2-AAF. Der Harn von Ratten enthielt nach i.p.-Injektion von 2-AAF-7ol in größerer Menge ein bisher unbekanntes Umwandlungsprodukt, das zuvor auch schon in kleinerer Menge im Harn nach Applikation von 2-AAF beobachtet worden war und das aufgrund seines Mole-

kulargewichts ($\frac{m}{e}$ = 255) als ein Dihydroxyderivat des 2-AAF erkannt wurde. Aufgrund seiner chromatographischen (stärker polar als 2-AAF-7ol) und spektroskopischen Eigenschaften (UV-Absorption ähnlich der von 2-AAF-3ol) kann zunächst angenommen werden, daß die eine Hydroxygruppe an C-7 und die andere an C-3 steht.

Dieser Befund zeigt, daß nach Einsetzen des ersten Sauerstoffatoms in 1-, 3-, 5- oder 7-Stellung ein zweites Sauerstoffatom auch noch in eine andere als die 9-Position eingeführt werden kann. Bemerkenswert ist, daß außerdem ein weiteres unbekanntes Umwandlungsprodukt isoliert wurde, das aufgrund seines chromatographischen und spektroskopischen Verhaltens möglicherweise ein 2-AAF-7.8-diol ist. Da Diphenole des 2-AAF nicht bekannt sind, muß für einen Konstitutionsbeweis die Synthese abgewartet werden.

Diese neuen Umwandlungsprodukte stellen aber nur den Teil der aus 2-AAF und 2-AAF-9on in vitro und in vivo gebildeten Metabolite dar, deren Konstitution aufgeklärt werden konnte. Die Zahl der nicht identifizierten Metabolite läßt vermuten, daß noch andere, unbekannte Stoffwechselwege existieren, auf denen 2-AAF biochemisch inaktiviert wird. Ob es sich bei diesen neuen Stoffwechselwegen tatsächlich um eine Inaktivierung handelt, müssen Toxizitätsprüfungen dieser neuen Verbindungen zeigen.

Stärker polare Metabolite von 2-AAF sind von verschiedenen Autoren beobachtet worden (1, 30, 39, 40, 41, 42), die ihnen die Konstitution von Diolen zugeschrieben haben, ohne sie zu charakterisieren oder den Beweis für die angenommene Konstitution zu erbringen.

Die Untersuchungen von MILLER et al. (4) und WEISBURGER et al. (3) haben ergeben, daß 2-AAF-7ol der Hauptmetabolit von 2-AAF ist, der 1945 von BIELSCHOWSKY entdeckt

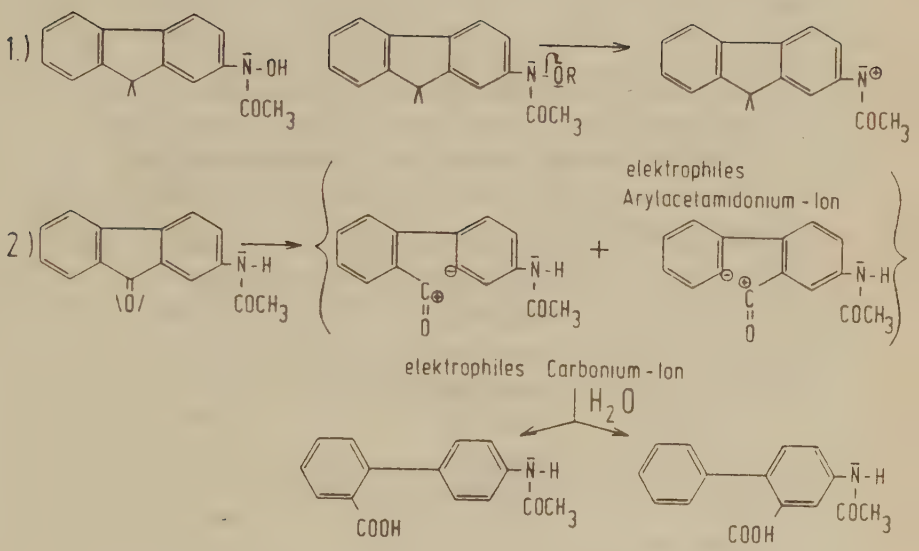
wurde (7) und daß 2-AAF-5ol, -3ol und -1ol mit abnehmender Geschwindigkeit gebildet werden. WEISBURGER et al. (1, 32) beanspruchen zwar, 2-AAF-6ol und 2-AAF-8ol entdeckt zu haben, aber der zur Identifizierung verwendeten Methode, die "inverse carrier isotope dilution technique", fehlt die notwendige Spezifität. In späteren Arbeiten von WEISBURGER und MILLER wurden dann auch weder 2-AAF-6- noch -8ol mehr erwähnt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen aber eindeutig, daß 2-AAF-8ol ein Metabolit von 2-AAF in der Ratte ist, dessen Nachweis und Identifizierung deshalb so schwierig war, weil das Verhältnis 2-AAF-7ol : 2-AAF-8ol 100 : 1 und die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Verbindungen sehr ähnlich sind. Es ist der guten Trennkapazität des chromatographischen Systems zuzuschreiben, daß der Nachweis der Anwesenheit überhaupt gelang. Dieses System gestattet aber keine Trennung von 2-AAF-4ol und -8ol sowie von 2-AAF-6ol und -7ol. Wenn die Mischungsverhältnisse dieser Partner ähnlich ungünstig oder gar noch ungünstiger sind, ist ein Nachweis der Anwesenheit von 2-AAF-4ol und -6ol mit chromatographischen Methoden zur Zeit nicht möglich.

Während 2-AAF in den meisten untersuchten Spezies - mit Ausnahme des Meerschweinchens - carcinogen wirkt, zeigen seine phenolischen Monohydroxyderivate deutlich geringere oder gar keine carcinogene Wirkung mehr (7 - 11). N-OH-2-AAF dagegen ist ein stärkeres Carcinogen als 2-AAF, es wurde daher als "proximate carcinogen" bezeichnet. Für die fehlende carcinogene Wirkung von 2-AAF im Meerschweinchen wurden zwei Ursachen diskutiert: entweder eine so kleine Geschwindigkeit der N-Hydroxylierung, daß keine toxischen Konzentrationen gebildet werden, oder eine so große Geschwindigkeit der metabolischen Inaktivierung, daß auch keine toxischen Konzentrationen entstehen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß Meerschweinchen nach i.p.-Injektion einer Mischung von

NOH-2-AAF und [9-^{14}C]-2-AAF nur sehr kleine Mengen ^{14}C-markiertes NOH-2-AAF zusammen mit einem großen Überschuß der nichtmarkierten Verbindung eliminiert und isoliert wurde. Unbehandelte Ratten, bei denen bisher ein Nachweis der N-Hydroxylierung weder in vivo noch in vitro geglückt ist, schieden unter identischen Versuchsbedingungen eine Menge ^{14}C-markiertes NOH-2-AAF mit dem Harn aus, die auch sehr klein war, aber doch deutlich größer als die im Meerschweinchen gefundene. Damit scheint die fehlende carcinogene Wirkung von 2-AAF im Meerschweinchen mit einer außerordentlich langsamen Geschwindigkeit der N-Hydroxylierung erklärt.

Auch 2-AAF-9on ist carcinogen (9, 26), doch ist nicht bekannt, ob, wie bei 2-AAF, die N-Hydroxylierung die Ursache dafür ist. Die Ergebnisse der in vitro-Versuche mit 2-AAF-9on sprechen dafür, daß 2-AAF-9on durch Kaninchenlebermikrosomen N-hydroxyliert wird, doch kann der Beweis für die Bildung eines N-Hydroxyderivates erst erfolgen, wenn ein Vergleich mit der synthetischen Verbindung möglich ist. WEISBURGER et al. (1, 32) haben mit der inversen Isotopenverdünnungsmethode ausgeschlossen, daß 2-AAF-9on in der Ratte unter Ringöffnung in die isomeren Acetylaminobiphenylcarbonsäuren übergeht, eine Reaktion, bei der möglicherweise ebenso ein elektrophiles Molekül gebildet wird wie bei der biochemischen Aktivierung von NOH-2-AAF (s. Schema 1).

Versuche, die durch Öffnung des Fünfrings entstehenden isomeren Acetylaminobiphenylcarbonsäuren (s. Schema 1) als Metabolite von 2-AAF im Harn zu entdecken, sind fehlgeschlagen, obwohl alle Voraussetzungen für ihre Isolierung und Identifizierung gegeben waren. An der erwarteten Stelle im Dünnschichtchromatogramm befand sich statt dessen ein anderer radioaktiver Metabolit von 2-AAF, 2-AAF-9on-5ol.



Die Biotransformation von 2-AAF ist in Fig. 12 schematisch dargestellt.
Sekundäre Oxygenierung wurde bei polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, wie Benzo(a)pyren (37, 43) oder 7,12-Dimethylbenzo(a)anthracen (38, 44) beobachtet.

Bemerkenswert, daß durch die sekundäre Oxygenierung von 7,8-dihydroxy-7,8-dihydro-benzo(a)pyren das stärker mutagene und carcinogene 7,8-dihydroxy-7,8-dihydro-9,10-epoxy-benzo(a)pyren entsteht (43). Toxikologische Versuche müssen zeigen, ob die beschriebenen sekundären Oxygenierungsprodukte stärkere oder schwächere Carcinogene als 2-AAF selbst sind.

4. Z U S A M M E N F A S S U N G

Synthetischer Teil

1. Synthesen von beschriebenen Monohydroxyderivaten des 2-AAF, weil eine Isolierung und Identifizierung der mit dem Harn eliminierten Umwandlungsprodukte von 2-AAF aufgrund der Literaturangaben allein nicht möglich war.

   2-AAF-1ol
   2-AAF-3ol
   2-AAF-4ol
   2-AAF-5ol
   2-AAF-6ol
   2-AAF-7ol
   2-AAF-8ol

2. Synthese von bekannten Derivaten des Biphenyls, um mit Hilfe der authentischen Substanzen den Harn auf Anwesenheit dieser Verbindungen als Metabolite von 2-AAF zu prüfen.

   2,4-Acetylaminobiohenylcarbonsäure
   2,4'-Acetylaminobiphenylcarbonsäure

3. Synthese von noch nicht beschriebenen Umwandlungsprodukten von 2-AAF- und 2-AAF-9on (neue Verbindungen).

2-AAF-9on-3ol	2-AAF-9.3-diol
2-AAF-9on-5ol	2-AAF-9.5-diol
2-AAF-9on-7ol	2-AAF-9.7-diol

Analytischer Teil

1. Vergleich der Geschwindigkeit der N-Hydroxylierung von 2-AAF im Meerschweinchen und in der Ratte mit Hilfe der Isotopenmarkierung.

2. Die Biotransformation von 2-AAF und 2-AAF-9on in vitro, katalysiert durch verschiedene Fraktionen von Leberhomogenat von Ratten und Kaninchen.

3. Die Biotransformation von 2-AAF und NOH-2-AAF in der Ratte: Trennung, Reinigung, Identifizierung und quantitative Bestimmung von Umwandlungsprodukten des 2-AAF und NOH-2-AAF, die mit dem Harn von Ratten nach i.p.-Injektion dieser Verbindungen ausgeschieden wurde.

   a) Folgende Monohydroxyderivate des 2-AAF wurden gefunden: 2-AAF-1ol, -3ol, -5ol, -7ol und -8ol; nicht gefunden wurden: 2-AAF-4ol und -6ol.

   b) 2,4- oder 2,4'-Acetylaminobiphenylcarbonsäure wurden im Harn von Ratten nach i.p.-Injektion von 2-AAF nicht gefunden.

   c) Als neue Metabolite von 2-AAF in der Ratte wurden die bisher nicht bekannten Dihydroxyderivate 2-AAF-9.3-diol, -9.5-diol und -9.7-diol aus dem Harn isoliert, mit dem sie teils frei, teils konjugiert ausgeschieden wurden. Beim Stehen an der Luft gehen sie in die stabilen Derivate des 2-AAF-9ons über, nämlich 2-AAF-9on-3ol, -5ol und -7ol. Die Konstitution dieser neuen Verbindungen wurde durch die Übereinstimmung ihrer chromatographischen und spektroskopischen Eigenschaften mit denen der synthetischen Verbindungen gesichert.

Von den übrigen Umwandlungsprodukten des 2-AAF, deren Konstitution nicht aufgeklärt wurde, wurden zwei näher charakterisiert und für sie die Struktur eines 2-AAF-3.7-diols bzw. 2-AAF-7.8-diols wahrscheinlich gemacht.

Danach führen zwei verschiedene Stoffwechselwege zu sekundären Oxygenierungsprodukten von 2-AAF: entweder 2-AAF wird zuerst an C-9 (Bildung von 2-AAF-9ol oder 2-AAF-9on) und dann an C-3, C-5 und C-7 oxygeniert, oder 2-AAF wird zuerst an C-7 (C-5, C-3 oder C-1) und dann an einer der übrigen freien Positionen, aber nicht an C-9, oxygeniert. Wie die sekundäre Oxygenierung die carcinogene Wirkung von 2-AAF beeinflußt, ist nicht bekannt.

5. BIOCHEMICA, CHEMIKALIEN, GERÄTE UND METHODEN

Biochemica

β-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat ($NADP^+$),
β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH),
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) und
Glucose-6-phosphat (Di-Na-Salz)
waren Produkte der Fa. Boehringer, Mannheim;

β-Glucuronidase, bacterial type I,
ein Produkt der Fa. Sigma Chemie GmbH, München und

β-Glucuronidase-Sulphatase, Suc d'Helix Pomatia,
ein Produkt der Industrie Biologique Française.

Chemikalien

2-Acetylaminofluoren: Fa. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
2-Nitrofluoren: Fa. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Fluoren-4-Carbonsäure: EGA-Chemie, Steinheim
2-Aminofluoren-9on: Aldrich Chemical Corp. Inc., Milwaukee/USA
3-Nitrofluoren: EGA-Chemie, Steinheim
1-Hydroxyfluoren: EGA-Chemie, Steinheim
2-Aminofluoren: Fluka AG, Neu-Ulm
1-Fluorencarbonsäure: Aldrich Chemical Corp. Inc., Milwaukee/USA
[9-^{14}C]-2-AAF (spezifische Aktivität: 10.15 mCi/mmol) von NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain

Lösungsmittel für die Dünnschichtchromatographie:
Merck p.a. Qualität.

Das zur präparativen Dünnschichtchromatographie verwendete Adsorbens war Kieselgel 60 PF_{254} der Fa. E. Merck, Darmstadt.
Kiegelgel Fertigplatten 60 F_{254} und Cellulose-Fertigplatten, Cellulose F, stammten ebenfalls von der Fa. E. Merck, Darmstadt.

Geräte

Die Radioaktivität auf Dünnschichtplatten wurde mit dem Dünnschichtscanner II (Lab. Prof. Dr. Berthold, 7574 Wildbad) gemessen.

Gezählt wurde die Radioaktivität im Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer Modell 3385 der Fa. Packard.

Extinktionskurven im Sichtbaren (500-350 nm) und Ultravioletten (350-220 nm) wurden mit dem Cary Recording Spectrophometer, Modell 118 (Varian) aufgenommen.

Die Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer SM-1A von Varian aufgenommen.

Die NMR-Spektren wurden mit Varian HA-100 gemessen.

Die ORD-Spektren wurden mit einem Cary 60 Spectropolarimeter der Firma Varian gemessen.

Die CD-Spektren wurden mit einem Dichographe Mark 3 von der Firma Instruments S.A., Paris gemessen.

Schmelzpunkte wurden mit dem Apparat nach Dr. Tottoli bestimmt.

Tiere

Sprague-Dawley-Ratten und Meerschweinchen (Mischrasse) wurden in Stoffwechselkäfigen aus rostfreiem Stahl (Acme) gehalten und erhielten Wasser und Trockenfutter (Altromin) der Firma Altromin in Lage ad libitum.

Methoden

I. In vitro-Versuche zur Biotransformation von 2-AAF und 2-AAF-9on mit verschiedenen Fraktionen von Ratten- und Kaninchenleberhomogenat

a) Das Ziel dieser Versuche war, das Metabolitenmuster von 2-AAF und 2-AAF-9on bei der Ratte kennenzulernen und nicht, Geschwindigkeiten von mehreren spezifischen metabolischen Reaktionen zu messen, die am gleichen Substrat angreifen. Daher wurden auch nicht die Faktoren untersucht, die die initiale Geschwindigkeit dieser mikrosomalen Reaktionen beeinflussen.

b) Induktion von Ratten mit 3-MCh.
14 - 30 männliche Ratten erhielten i.p.-Injektionen von 10 mg 3-MCh/kg in Olivenöl einmal täglich am 1., 4., 7. und 11. Tag innerhalb von 14 Tagen. 24 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und die Lebern entnommen.

c) Induktion von Kaninchen mit 3-MCh.
Männliche oder weibliche Kaninchen von 2,0 - 2,5 kg Gewicht erhielten i.p.-Injektionen von 10 mg 3-MCh/kg in Olivenöl einmal täglich am 1., 4., 7. und 11. Tag innerhalb von 14 Tagen.
24 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und die Lebern entnommen.

d) Präparation von Lebermikrosomen und der löslichen Fraktion von Leberhomogenat.
Die Lebern von 14 - 30 Ratten oder von 5 - 12 Kaninchen wurden bei 4°C in Stücke geschnitten und durch einen Fleischwolf passiert. Das Leberhomogenat suspendierte man in 2 Vol. 0,15 mol KCl/l und homogenisierte 30 Minuten durch intensives Rühren. Die Suspension wurde 30 Minuten bei 9000 U/min = 9900 x g in einer MSE-Zentrigufe zentrifugiert. Das Sediment, bestehend aus nicht aufgeschlossenen Hepatocyten und Mitochondrien, wurde verworfen und die überstehende Suspension 1 Stunde bei 30 000 U/min = 90 000 x g in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Hälfte des Überstandes ersetzte man durch 0,15 mol KCl/l, homogensierte und zentrifugierte die Suspension bei 90 000 x g. Der Überstand wurde vollständig dekantiert und das Sediment in 0,15 mol KCl/l resuspendiert. Anschließend zentrifugierte man erneut 1 Stunde bei 90 000 x g. Nach vollständigem Dekantieren des Überstandes wurde die Waschung noch einmal wiederholt und das erhaltene Sediment in 0,15 mol Kaliumhydrogenphosphat Puffer, pH 7.4, resuspendiert.

e) Proteinbestimmung
Der Proteingehalt der Mikrosomensuspension oder des löslichen Überstandes wurde nach ROBINSON und HOGDEN (27) bestimmt, mit der Modifikation durch SZARKOWOSKA und KLINGENBERG (28). Die Methode, die von HESSE und LANGE (29) auf die Proteinbestimmung der Mikrosomenfraktion übertragen wurde, ist wie folgt :
0,2 ml der Mikrosomensuspension oder des löslichen Überstandes wird mit Auqa dest. 1 : 3 verdünnt; man pipettiert 3 aliquods von 0,1 ml ab und setzt 0,4 ml aqua dest. und 1 ml 10 % Trichloressigsäure zu jeder Probe zu, worauf das Protein ausfällt. Die Proben werden 10 Minuten bei 9000 U/min und 4° C zentri-

fugiert, die überstehende Lösung wird abdekantiert und die Röhrchen umgekehrt auf Fließpapier gestellt, um die wässrige Phase vollständig zu entfernen. Das Sediment wird mit 2 ml Biuret-Reagens (Merkotest) homogenisiert und die Suspension 30 Minuten geschüttelt. In dieser Zeit ist eine blaue, nicht immer ganz klare Lösung entstanden, zu der 2 ml aqua dest. gegeben werden und deren Extinktion bei = 546 nm abgelesen wird. Als optischer Vergleich dient eine Lösung, die aus 0,2 ml aqua dest. und 0,5 ml 10 % Trichloressigsäure bereitet wird. Durch Zusatz einiger Kristalle KCN wird die Lösung entfärbt und deren Extinktion von der vorher ermittelten substrahiert.
Aus der Differenz der Extinktionen wird die Proteinkonzentration berechnet.

f) Zusammensetzung der Inkubate.
Die Inkubate mit der Mikrosomenfraktion oder dem löslichen Überstand als Enzymquelle enthielten in 100 ml:
1,2 mmol/l $NADP^+$, 10 mmol/l Glucose-6-phosphat, 350 I.E. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase/l, 6 mmol/l Mg Cl_2, 0,1 mol/l NaF (zur Hemmung der Acylamidasen), 3 mg mikrosomales oder lösliches Protein/ml und Substrat in einer Konzentration von 10^{-3} mol/l. Einigen Ansätzen wurde 1.2 mM NADH zugesetzt.
Die Substrate 2-AAF oder 2-AAF-9on wurden in 1,7 ml warmem Methanol gelöst der Suspension zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten, die Badtemperatur 37^{o} C und die Schüttelsequenz 184 Oszillationen/min. Die Inkubation wurde durch die Zugabe des gleichen Volumens Essigester gestoppt.
Wenn NaF den Ansätzen nicht zugesetzt wurde, ist dies im Text erwähnt.

g) Aufarbeitung der Ansätze.
Nach Abtrennung der organischen Phase wurde die wässrige Phase mit 5 ml 2 M HCl/100 ml Inkubat angesäuert und nochmals mit gleichem Volumen Essigester extrahiert. Beide Essigesterauszüge wurden vereinigt, mit Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. zum Trocknen gebracht. Der Verdampfungsrückstand wurde zwischen Äther und 2 M NaOH verteilt und dieser Vorgang mit der abgetrennten Ätherphase nochmals wiederholt. Die ätherische Lösung, die die neutralen und basischen Metabolite von 2-AAF und 2-AAF-9on enthielt, wurde i. Vak. zur Trockne gebracht und der Rückstand auf eine oder zwei präparative Dünnschichtplatten (20 x 40 cm, 0,8 mm Kieselgel 60 PF_{254}) aufgetragen, parallel dazu einige synthetische Derivate als Vergleich.
Die wässrig alkalische Phase, die die sauren Metabolite enthielt, wurde angesäuert und mit Essigester extrahiert. Die getrocknete Essigesterlösung wurde im Vakuum zur Trockne gebracht und der Rückstand auf präparative Dünnschichtplatten aufgetragen, parallel dazu einige authentische Derivate des AAF als Vergleich. Die Entwicklung erfolgte in verschiedenen Lösungsmittelgemischen.

II. In Vivo - Versuche

a) Aufarbeitung des Versuches mit markiertem [9-^{14}C]-2-AAF.
Ein Gemisch von 11 mg [9-^{14}C]-2-AAF und 1600 mg NOH-2-AAF wurde in 32 ml Olivenöl gelöst und in einer Dosis von 50 mg/kg Ratten injiziert. Der 24 Stunden danach ausgeschiedene Harn und der innerhalb des zweiten Tages gesammelte Harn wurden bis zur Aufarbeitung bei -20° C getrennt aufbewahrt. Der aufgetaute Harn wurde nach Einstellung des pH auf 6.8 zentrifugiert. Nach Dekantieren des klaren

Überstandes wurde darin die Radioaktivität bestimmt. Anschließend wurde er mit 500 mg β-Glucuronidase und 10 ml Chloroform versetzt und 6 Stunden bei 37°C unter intensivem Rühren inkubiert. Nach Einstellen des pH auf 6.0 wurde 3 Mal mit den gleichen Volumen Äther extrahiert; die vereinigten getrockneten Ätherextrakte engte man i. Vak. auf etwa 1 l ein. Durch 3maliges Schütteln des Ätherextraktes mit je 50 ml 1 M NaOH wurden dem Extrakt die sauren Inhaltsstoffe entzogen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wurde der Ätherextrakt (Fraktion N_1 + B_1), der nur noch die neutralen und basischen Bestandteile enthielt, zur Trockne eingedampft.
Die wässrig-alkalischen Auszüge, die die sauren Umwandlungsprodukte enthielten, wurden vereinigt, mit 2 M HCl angesäuert und 2 Mal mit dem gleichen Volumen Diäthyläther und anschließend mit dem gleichen Volumen n-Butanol extrahiert. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wurden die kombinierten Äther- und Butanolextrakte zur Trockne gebracht (Fraktion S_1).

Der Harn wurde nach Einstellen des pH auf 5.2 mit Eisessig mit β-Glucuronidase-sulphatase unter Zusatz von 10 ml Chloroform 15 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach Einstellen des pH auf 6.0 wurde 3mal mit gleichen Volumina Diäthyläther extrahiert und eine Trennung der sauren von den basischen und neutralen Inhaltsstoffen, wie beschrieben, vorgenommen [$(N+B)_2$ + S_2].

b) Aufarbeitung des Versuchs mit nichtmarkiertem 2-AAF. 30 männliche Ratten erhielten zweimal im Abstand von 7 Tagen i.p.-Injektionen von 50 mg 2-AAF/kg, suspendiert in 0,5 % Agar-Agar. Die beiden 24 Stunden danach ausgeschiedenen Harnvolumina, zusammen 1660 ml. wurden ohne Veränderung des pH (9.3) mit 1 l Chloroform extrahiert. Nach Adjustieren des pH auf 5.0 wurde der Harn anschließend mit je 1 l

Essigester extrahiert. Danach wurde der pH auf 5.2 eingestellt und der Harn 24 Stunden lang unter Zusatz von 2 Ampullen Suc d'Helix Pomatia und 5 ml Chloroform inkubiert. Anschließend wurde er 2 Mal mit je 1 l Essigester extrahiert. Der Chloroformextrakt und der erste Essigesterextrakt enthielten die nicht-konjugierten Metabolite, und der zweite Essigesterextrakt die mit dem Harn ausgeschiedenen konjugierten Metabolite, die auf enzymatischem Wege freigesetzt wurden. Alle drei Extrakte wurden getrennt aufgearbeitet. Ergebnis s. Fig. 9, 10 und 11.

III. Chromatographische Trennung von Monohydroxyderivaten des 2-AAF und 2-AAF-9ons

WEISBURGER et al. (2, 30) und MILLER et al. (5, 31), die als erste die Biotransformation von 2-AAF untersucht haben, verwendeten zur Trennung von Monohydroxyderivaten die Papierchromatographie und ein zweiphasisches Fließmittel, das nach Angaben der Autoren aber keine befriedigende Trennung dieser Metabolite bewirkte. Von den geprüften Lösungsmittelgemischen erwies sich das System D (s. Tab. 7) noch als am besten zur Trennung der 8 verschiedenen Monohydroxyderivate von 2-AAF geeignet, obwohl, wie Fig. 14 zeigt, eine Trennung des 2-AAF-6ol von -7ol und des 2-AAF-4ol von -8ol selbst mit diesem System nicht gelang. Wie Fig. 14 zeigt, war auf Kieselgel-Fertigplatten eine Trennung einiger Monohydroxyderivate von ihren sekundären Oxygenierungsprodukten, den 2-AAF-9on-olen mit dem Fließmittel erfolgreich. Allerdings war eine Unterscheidung zwischen 2-AAF-9on-7ol und -5ol mit diesem System nicht möglich. Eine Trennung dieser beiden Verbindungen erfolgte mit dem System I; Fig. 15. Die Ergebnisse zeigen, daß wegen ihrer unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften eine vollständige Trennung des komplexen Metabolitengemisches mit einem Lösungsmittelgemisch allein nicht möglich ist. Deshalb wurde so verfahren: Die Komponenten des Chloroform und Essigester-

extraktes wurden zuerst mit einem polaren Fließmittel getrennt, wobei Zonen unterschiedlicher Polarität beobachtet wurden, Siehe Fig. 9, 10, 11. Jede dieser Zonen enthielt aber nicht nur eine, sondern mehrere Komponenten, die bei der anschließenden Rechromatographie mit einem wenig polaren Fließmittel getrennt wurden, s. Fig. 9, 10 und 11. Bei der ersten Chromatographie wurden demnach die Metabolite mit großen Polaritätsunterschieden getrennt, bei der Rechromatographie Metabolitengemische mit geringen Polaritätsunterschieden.

IV. Identifizierung und quantitative Bestimmung der Metabolite

Wenn sich bei mehrfacher Entwicklung der Chromatogramme die einzelnen Zonen deutlich getrennt hatten, wurden sie herauspräpariert und ihre Inhaltsstoffe mit Methanol p. a. eluiert. Ein Metabolit galt als identifiziert, wenn nicht nur sein R_f-Wert im DSC, sondern auch das UV-Absorptionsspektrums mit dem der synthetisch gewonnenen Verbindung übereinstimmte. Die quantitative Bestimmung der Umwandlungsprodukte erfolgte durch Vergleich der Extinktion des Methanol-Eluats mit der einer Lösung des Metaboliten mit bekannter Konzentration. Auf die Quantifizierung von 2-AAF-9.7-, -9.5- und -9.3-diol mußte wegen der Instabilität dieser Verbindungen verzichtet werden. Gestattete das UV-Spektrum keine eindeutige Identifizierung, dann wurde der Metabolit durch Rechromatographie weiter gereinigt.

Gelegentlich wurde beobachtet, daß aus einer ursprünglich einheitlichen Zone im DS-Chromatogramm bei der Rechromatographie 3 Zonen entstanden. Die erste chromatographische Trennung der Umwandlungsprodukte von 2-AAF-9on (in vitro-Versuch) ergab z.B. eine Zone, deren Eluat das in Abb. 29 gezeigte UV-Absorptionsspektrum zeigte.

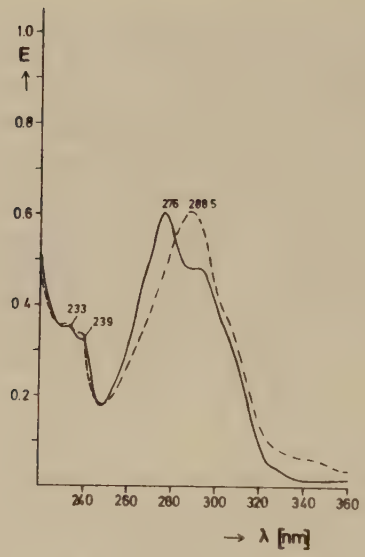


Abb. 29

Bei der Rechromatographie dieser Substanz entstanden 3 andere Substanzen, die als 2-AAF-9on, 2-AAF-9ol und 2-AAF-9on-7ol identifiziert wurden. Die Vermutung liegt nahe, daß das Substrat und die beiden Produkte durch Lipide miteinander "verklebt" waren und dieser nicht allzu stabile Komplex durch Einwirkung von Lösungsmitteln, Adsorbentien und Temperatur zerfällt.

V. Bestimmung der Radioaktivität

Bei der Aufarbeitung der markierten Metabolite wurde im Anschluß an die Quantifizierung durch UV-Messung die Radioaktivität bestimmt, um Aussagen über das Verhältnis markierter zu nichtmarkierter Substanz machen zu können.

Die Radioaktivität im Harn und in Lösungen wurde mit dem Bray Scintillator bestimmt, der folgende Zusammensetzungen hatte :

1,4-bis-2(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol (POPOP)	200 mg
Naphtalin	60 g
2,5-Diphenyloxazol (PPO)	4 g
Methanol	10 ml
Äthylglykol	20 ml
Dioxan	ad 1000 ml

Tripletts von aliquoten Teilen Extrakte oder Harne wurden mit 15 ml Bray-Scintillator versetzt und 10 Minuten in einem Liquid Scintillation Counter der Type 3324 (Packard) 30/nn gezählt. Parallel wurde die Zählzahl eines Nullwertes bestimmt, der anstelle der Lösung das reine Lösungsmittel enthielt. Die Umrechnung von cpm auf dpm erfolgte mit Hilfe des Kanalraten-Verhältnisses (Eichkurve).

VI. Verlustbestimmung von 2,4'-Acetylaminobiphenylcarbonsäure

Da die isomeren Acetylaminobiphenylcarbonsäuren im Harn von Ratten nach Applikation von 2-AAF nicht gefunden wurden, interessierte, wieviel von einer dem Harn zugesetzten Menge nach allen Operationen der Isolierung und Identifizierung wiedergefunden wird.
In Vorversuchen mit Puffer von pH 2 - 6 war ermittelt worden, daß 2,4'-Acetylaminobiphenylcarbonsäure nur bei pH 2 mit Essigester quantitativ zu extrahieren war. Nachdem festgestellt worden war, daß von kleineren Mengen nichts wiedergefunden wurde, wurden 3,26 mg 2,4'-Acetylaminobiphenylcarbonsäure in 300 ml Rattenharn gelöst und der Prozedur der Isolierung und Identifizierung unterworfen.

Ergebnis

0,31 % der eingesetzten Menge wurde zurückgewonnen. Das bedeutet, daß wenn 2,4'-Acetylaminobiphenylcarbonsäure in noch geringerer Menge im Harn enthalten wäre, sie nicht mehr nachgewiesen werden könnte.

Tabellen und Figuren

zum methodischen Teil

Tab. 7 : Fließmittel, die bei der Trennung der Metabolite benutzt wurden

Für neutrale und basische Metabolite :

A) Chloroform : Methanol = 98 : 2
B) Chloroform : Methanol = 95 : 5

Für saure Metabolite :

C) Cyclohexan : Eisessig = 92,5 : 7,5
D) Chloroform : Methanol : Eisessig = 98 : 2 : 1
E) Chloroform : Methanol = 95 : 5
F) Chloroform : Methanol : Eisessig = 95 : 5 : 1
G) Chloroform : Methanol = 90 : 10
H) Benzol : Dioxan : Eisessig = 45 : 16 : 4
I) Dichloräthan : Essigester : Ameisensäure = 60 : 38 : 2

Fig. 14

Dünnschichtchromatographische Trennung von a) Mono-Oxyderivaten von 2AAF
auf DC-Fertigplatten KIESELGEL 60 F-254 b) Mono- und Dioxyderivaten von 2AAF

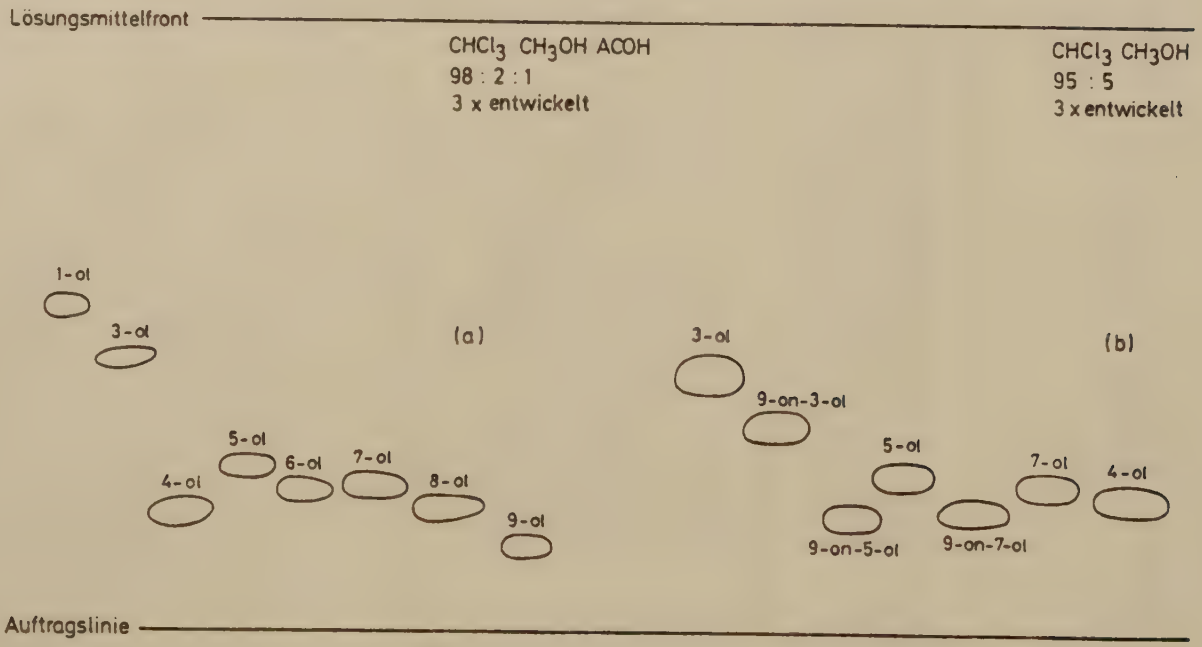


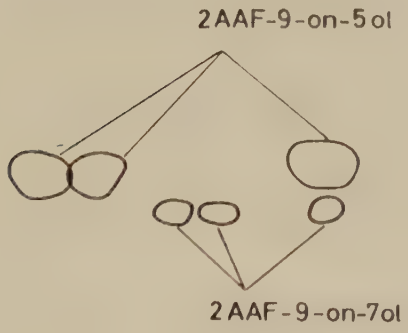
Fig. 15

Dünnschichtchromatogr. Trennung von 2AAF-9-on-5-ol und 2AAF-9-on-7-ol

Dichloräthan - Essigester - Ameisensäure
60 38 2

3-mal entwickelt

Lösungsmittelfront ————————————————



o o o o o Auftragspunkte

6. L I T E R A T U R

1. J.H. WEISBURGER, E.K. WEISBURGER and H.P. MORRIS:
J. Natl. Cancer Inst. 17, 345 (1956)

2. J.H. WEISBURGER, E.K. WEISBURGER, H.P. MORRIS and H.A. SORBER:
J. Natl. Cancer Inst. 17, 363 (1956)

3. P.H. GRANTHAM, R.E. HORTON, E.K. WEISBURGER and J.H. WEISBURGER:
Biochem. Pharmac. 19, 163 (1970)

4. J.A. MILLER, J.W. CRAMER and E.C. MILLER:
Cancer Res. 20, 950 (1960)

5. J.W. CRAMER, J.A. MILLER and E.C. MILLER:
J. biol. Chem. 235, 885 (1960)

6. W. FRIES, M. KIESE and W. LENK:
Xenobiotica 3, 525 (1973)

7. F. BIELSCHOWSKY:
Brit. Med. Bull. 4, 382 (1947)

8. C. HOCH-LIGETI:
Brit. J. Cancer 1, 391 (1947)

9. H.P. MORRIS, C.A. VELAT, B.P. WAGNER, M. DALLGARD and F.E. RAY:
J. Natl. Cancer Inst. 24, 149 (1960)

10. E.C. MILLER, J.A. MILLER and H.A. HARTMANN:
Cancer Res. 21, 815 (1961)

11. C.C. IRVING, H.R. GUTMANN and D.M. LARSON:
Cancer Res. 23, 1782 (1963)

12. M.E. URQUHART:
Brit. J. Cancer 9, 611 (1955)

13. E.K. WEISBURGER and J.H. WEISBURGER:
Adv. Cancer Res. 5, 331 (1958)

14. E.C. MILLER, J.A. MILLER and M. ENOMOTO:
Cancer Res. 24, 2018 (1964)

15. J.A. MILLER and E.C. MILLER:
In: Carcinogenesis: A Broad Critique.
University of Texas, M.D. Anderson Hospital
and Tumor Institute of Houston, p. 397.
The Williams and Wilkins Co., Baltimore 1967

16. J.A. MILLER and E.C. MILLER:
Progr. Exptl. Tumor Res. 11, 273 (1969)

17. J.A. MILLER:
Cancer Res. 30, 559 (1970)

18. H.R. GUTMANN, S.B. GALITSKI and W.A. FOLEY:
Cancer Res. 27, 1443 (1967)

19. H.R. GUTMANN, E.J. BARRY and D. MALEJKA-GIGANTI:
J. Natl. Cancer Inst. 43, 287 (1969)

20. E.C. MILLER and J.A. MILLER:
Ann. N.Y. Acad. Sci. 163, 731 (1969)

21. J.H. WEISBURGER and E.K. WEISBURGER:
Pharmacol. Rev. 25, 1 (1973)

22. E.J. BARRY and H.R. GUTMANN:
J. biol. Chem. 248, 2730 (1973)

23. Y. YOST, H.R. GUTMANN and R.E. RYDELL:
Cancer Res. 35, 447 (1975)

24. H.T. NAGASAWA and A.J. OSTERAAS:
Biochem. Pharmac. 13, 713 (1964)

25. K. BENKERT, W. FRIES, M. KIESE and W. LENK:
Biochem. Pharmac. 24, 1375 (1975)

26. J.A. MILLER, R.B. SANDIN, E.C. MILLER and H.P. RUSCH:
Cancer Res. 15, 188 (1955)

27. H.W. ROBINSON and C.G. HOGDEN:
J. biol. Chem. 135, 727 (1940)

28. L. SZARKOWSKA and M. KLINGENBERG:
Biochem. Z. 338, 674 (1963)

29. S. HESSE and G. LANGE:
unveröffentlicht

30. E.K. WEISBURGER, P.H. GRANTHAM and J.H. WEISBURGER:
Biochemistry 3, 808 (1964)

31. P.D. LOTLIKAR, M. ENOMOTO, J.A. MILLER and E.C. MILLER:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 341 (1967)

32. J.H. WEISBURGER, E.K. WEISBURGER, P.H. GRANTHAM and H.P. MORRIS:
J. biol. Chem. 234, 2138 (1959)

33. J.C. ARCOS and M.F. ARGUS:
Adv. Cancer Res. 11, 305 (1968)

34. R. TAKENOSHITA and S. TOKI:
J. biol. Chem. 249, 5428 (1974)

35. R.E. BILLINGS, H.R. SULLIVAN and R.E. McMAHON:
Biochemistry 9, 1256 (1970)

36. I. BJÖRKHEM and M. HAMBERG:
J. biol. Chem. 246, 7417 (1971)

37. P. SIMS, P.L. GROVER, A. SWAISLAND, K. PAL and A. HEWER:
Nature 252, 336 (1974)

38. J. BOOTH, G.R. KEYSELL and P. SIMS:
Biochem. Pharmac. 22, 1781 (1973)

39. J.H. WEISBURGER, E.K. WEISBURGER and H.P. MORRIS:
Arch. Biochem. Biophys. 80, 187 (1959)

40. J.H. WEISBURGER, E.K. WEISBURGER, P.H. GRANTHAM and H.P. MORRIS:
J. Natl. Cancer Inst. 22, 825 (1959)

41. J.H. WEISBURGER, E.K. WEISBURGER and H.P. MORRIS:
Cancer Res. 18, 1039 (1958)

42. P. GRANTHAM:
Biochem. Pharmac. 16, 429 (1967)

43. D.M. JERINA, H. YAGI, D.R. THAKKER, W. LEVIN, A.W. WOOD and A.H. CONNEY:
Abstracts of the 7th International Congress of Pharmacology, Vol. 1, p. 12 (1978)

44. P. SIMS :
In: Biological Reactive Intermediates, Formation, Toxicity and Inactivation, ed. by D.J. Jollow, J.J. Kocsis, R. Snyder and H. Vainio.
p. 358, Plenum Press New York 1977

Den Herren Professor Dr. M. Kiese und Professor Dr. W. Lenk danke ich für die mir während der Bearbeitung des Themas erwiesene Unterstützung und Anleitung.
Herrn Prof. Dr. H. Schönenberger danke ich für das Korreferat.
Mein Dank gilt auch Frl. G. Schild und Frl. I. Burow, Max Planck-Institut für Biochemie, München, für die Aufnahme der NMR- und Massenspektren;
Herrn Dr. J. Sonnenbichler und Herrn Dr. W. Schäfer, Max Planck-Institut für Biochemie, München, für die Diskussion der NMR- und Massenspektren sowie Frl. M. Regiert und Frau B. Goik für die sehr gute technische Assistenz.

L E B E N S L A U F

23.10.1949	geboren in Erpel/Rhein als Tochter des Kaufmanns Werner Rosenbauer (gest. 1960) und der Lehrerin Margret Rosenbauer, geb. Philipp
1956 - 1960	Volksschule Unkel / Rhein
1960 - 1968	Staatl. Gymnasium Linz / Rhein
Juni 1968	Reifeprüfung
Aug. 1968 - Juli 1970	Pharmazeutisches Praktikum in der Kurapotheke Bad Hönningen
Juli 1970	Vorexamen
WS 1970 - SS 1973	Studium der Pharmazie an der Johann Gutenberg-Universität Mainz
Oktober 1973	Staatsexamen Pharmazie
seit WS 1975/76	Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
März 1977	Physikum
März 1978	1. Medizinisches Staatsexamen an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.

Im März 1974 begann ich unter Anleitung von Prof. Dr. med. M. Kiese und Prof. Dr. rer. nat. W. Lenk am Pharmakologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München mit der vorliegenden Dissertation

Herstellung: Druck u. Verlag E. R. Blanchard, Friedrich-Verleger-Straße 10-12, 4800 Bielefeld 1
Telefon 05 21 / 17 31 97